

## 明 細 書

### 新規PlexinポリペプチドとそれをコードするDNA、及びその用途

#### 技術分野

- [0001] 本発明は、Plexin様配列を有し、個体発生時の血管形成時期の初期から血管形成時期全般を通して血管特異的に発現し、成長後の成体では胃・重層扁平上皮に於いて強い発現、子宮に於いてやや強い発現が、また、脳をはじめとした各種臓器に於いて発現が認められる新規DNA及び該DNAを含む遺伝子、該DNAにコードされる新規ポリペプチド及び該ポリペプチドを含む組換え蛋白質、新規ポリペプチドに対する抗体、並びに、血管細胞増殖分化制御、癌増殖を支持する血管増殖阻害に関わる制御する生体内血管増殖分化制御因子、化合物のスクリーニング方法、及び該分化制御因子、化合物の血管増殖分化制御活性測定キットに関する。

#### 背景技術

- [0002] 近年のヒトゲノムプロジェクト及びヒトcDNAプロジェクトの成功により、多くのヒト疾患関連遺伝子が同定あるいは推定されるにいたった。しかしながらその一方で倫理上の問題からヒト遺伝子を用いた研究には制約があり、新たな研究の方向性が模索されている。このような観点からモデル生物における相同遺伝子を同定することは、研究を進展させる意味できわめて重要なステップと考えられる。特に齧歯類、とりわけマウスは最も研究が進んでいるモデル生物で、ゲノム情報や変異種の情報も比較的多く蓄積されているが、蓄積されたゲノム情報はまだ十分なものではない。一方、生体内で発現している遺伝子を解析する手段として、cDNAの配列をランダムに解析する研究がなされ、得られたcDNAの断片配列がExpressed Sequence Tag (EST)としてデータベースに登録、公開がなされた。しかし、多くのESTは100塩基長から500塩基長といった短い塩基配列情報のみであり、その機能を推定することは困難である。
- [0003] 各種臓器においては、多くのホルモン、ホルモン様物質、神経伝達物質あるいは生理活性物質による調節のもとで生理的な機能の調節が行なわれている。また、各種臓器における機能の調節には、機能を受け持つ特異的な細胞の増殖やガイダンス、あるいは細胞の活性化が関係している。従って、個体発生時の血管形成時期の初期

から血管形成時期全般を通して血管特異的に発現する等、各種臓器に於いて発現が認められる新規な遺伝子を取得して、その遺伝子にコードされる血管形成あるいは各種臓器で複雑な機能を調節する蛋白質を得ることは、医薬品開発に有用である。また、得られた蛋白質に対するアゴニスト、アンタゴニストを効率よくスクリーニングし、医薬品を開発するためには、生体内で発現している該蛋白質の遺伝子の機能をホモロジー検索から推定し、その情報を基にして該蛋白質を適当な発現系で発現させて組換え蛋白質を得、更にして該蛋白質に特異的に結合する抗体を得ることが必要であった。また、マウスES細胞を用いた血管形成をモデル化した実験系に於いて、血管形成に関わる遺伝子を網羅的に取得する試みがなされ、基礎的な知見の蓄積が進んでいる(文献14)。しかし、血管形成に関わる4,000塩基長以上の齧歯類、とりわけマウス由来の長大な遺伝子について報告はない。

[0004] 長鎖ヒトcDNAプロジェクトにて、ヒト脳由来のヒトKIAA0620遺伝子

(Ishikawa,K.,Nagase,T., Suyama,M., Miyajima,N.,Tanaka,A., Kotani, H. Nomura,N. and Ohara,O.,DNA Res., 1998, 5:169-176, Prediction of the coding sequences of unidentified human genes X. The complete sequences of 100 new cDNA clones from brain which can code for large proteins in vitro., GenBank Accession No. AB014520, 6,754 bp, 1,746aa, Homosapiens, cDNA, KIAA0620, Ohara O. et al.) が報告され、マウス発生過程において血管内皮細胞あるいは中枢神経系(CNS)でヒトKIAA0620関連遺伝子のmRNAが発現していること等が報告(van der Zwaag, B. et al., Dev. Dyn., 2002 , 225:336-343)されているが、その機能については不明であった。

[0005] ヒトKIAA0620遺伝子は染色体染色体3q21.3に存在し、更に、ヒトKIAA0620遺伝子のSNPsも複数箇所報告されている

([http://www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/query.fcgi?db=nucleotide&cmd=Display&dopt=nucleotide\\_snp&from\\_uid=3327053](http://www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/query.fcgi?db=nucleotide&cmd=Display&dopt=nucleotide_snp&from_uid=3327053))。ヒト疾患の大部分が単なる遺伝子の欠失によって引き起こされるのではなくて、アミノ酸置換によって蛋白質の機能や活性が一部分だけ変化することにより引き起こされることを鑑みると、ヒトKIAA0620遺伝子は傷治癒、骨折治癒、血管閉塞と側副血行路形成、子宮粘膜での周期的血管網形成(一過

性、黄体形成時)等、また、血管新生過程が関与しそれが望ましくない癌増殖、慢性関節リュウマチ、糖尿病性網膜症、子宮内膜症、肥満、また、血管新生過程が望ましい心臓発作、神経変性疾患、足の血行障害、閉塞性動脈硬化症、尋常性乾癬といった各種疾患に関与している可能性が考えられる。ヒトKIAA0620遺伝子を用いた、マウス発生過程での血管内皮細胞あるいは中枢神経系(CNS)でヒトKIAA0620関連遺伝子のmRNAが発現していることが報告されたが、ヒトKIAA0620遺伝子とその関係をより詳細に研究するためには、ヒトではなく実験動物を用いた研究が必須である。しかし、ヒト病態の解明に重要なモデル動物である齧歯類、とりわけマウスに於けるヒトKIAA0620遺伝子に対応する遺伝子は未取得であり、該遺伝子を用いた研究を実施することが出来なかった。

- [0006] 非特許文献1:1. 渋谷正史,1999,実験医学,17:712-715, 血管新生研究の現状と分子調節機構
- 非特許文献2:2. 平島正則,西川伸一,1999,実験医学,17:716-720,血管内皮細胞の発生学
- 非特許文献3:3. 山下潤,2001,実験医学,19:830-835, ES細胞からの血管形成
- 非特許文献4:4. 高倉伸幸, 2001,実験医学,19:836-840, 血管細胞と血管新生
- 非特許文献5:5. 宿南知佐,柴田洋之,開祐司,2001,実験医学,19:841-846, 軟骨・骨形成と血管侵入
- 非特許文献6:6. 松浦成昭,岡崎能久,谷直之,江口英利,1999,実験医学,17:741-752, 腫瘍の産生する血管新生阻害因子
- 非特許文献7:7. ジェイン,R.K. & カルメリ,P.F.,2002, 日経サイエンス,3月号,22-29, 医療を変える血管新生の科学
- 非特許文献8:8. van der Zwaag, B. et al., Dev. Dyn., 2002 , 225:336-343, PLEXIN-D1, a novel plexin family member, is expressed in vascular endothelium and central nervous system during mouse embryogenesis.
- 非特許文献9:9. Tamagnone L, Artigiani S, Chen H, He Z, Ming GI, Song H, Chedotal A, Winberg ML, Goodman CS, Poo M, Tessier-Lavigne M, Comoglio PM., 2001, Cell, 99:71-80, Plexins are a large family of receptors for transmembrane,

secreted, and GPI-anchored semaphorins in vertebrates.

非特許文献10:10. Manahan, D., 1997, Science, 277:48-50, Signaling vascular morphogenesis and maintenance.

非特許文献11:11. Barinaga, M., 1997, Science, 275:482-484, Designing therapies that target tumor blood vessels.

非特許文献12:12. Asahara T, Murohara T, Sullivan A, Silver M, van der Zee R, Li T, Witzenbichler B, Schatteman G, Isner JM. Asahara, T. et al., 1997, Science, 275:964-967, Isolation of putative progenitor endothelial cells for angiogenesis.

非特許文献13:13. Risau, W., 1997, Nature, 386:671-674, Mechanisms of angiogenesis.

非特許文献14:14. Yamashita J, Itoh H, Hirashima M, Ogawa M, Nishikawa S, Yurugi T, Naito M, Nakao K, Nishikawa S. Flk1-positive cells derived from embryonic stem cells serve as vascular progenitors.

非特許文献15:15. Ishikawa K, Nagase T, Suyama M, Miyajima N, Tanaka A, Kotani H, Nomura N, Ohara O., 1998, DNA Res., 5:169-76, Prediction of the coding sequences of unidentified human genes X. The complete sequences of 100 new cDNA clones from brain which can code for large proteins in vitro.

非特許文献16:16. Tamagnone L, & Comoglio PM., 2000, Trends in Cell Biology, 10:377-383, Signalling by semaphorin receptors: cell guidance and beyond.

非特許文献17:17. Shimizu M, Murakami Y, Suto F, Fujisawa H, 2000, J. Cell Biol., 148:1283-1293, Determination of cell adhesion sites of neuropilin-1.

## 発明の開示

### 発明が解決しようとする課題

[0007] 従来、ヒト長鎖cDNAプロジェクトでヒトKIAA0620遺伝子が取得されていたが、遺伝子情報が完全でなく、その機能に関する情報も不完全であった。すなわち、ヒトKIAA0620遺伝子をプローブとしてマウス発生過程でのヒトKIAA0620関連遺伝子発現の検出実験において、血管内皮細胞あるいは中枢神経系(CNS)においてヒトKIAA0620遺伝子と反応するmRNAが発現していることが報告された。しかし、ヒト



KIAA0620遺伝子あるいはそれと関連する遺伝子の機能についてより詳細に研究するためには、ヒトではなく実験動物を用いた研究が必須であり、ヒト病態の解明に重要なモデル動物である齧歯類に属するラット、マウスあるいはハムスター等、とりわけマウスに於けるヒトKIAA0620遺伝子に対応する遺伝子とその取得が困難であったため未取得のまま放置され、該遺伝子を用いた研究を実施することが出来なかった。

[0008] 従って、ヒトKIAA0620遺伝子に関連する齧歯類に由来するラット、マウスあるいはハムスター等、とりわけマウス由来新規遺伝子を取得し、本発明の新規遺伝子がコードする蛋白質の機能に関する情報を得ることは、本発明のポリペプチドの特異的結合蛋白質や、アゴニスト、アンタゴニストを検索する際の非常に重要な手段となる。上記のポリペプチドに対する特異的結合蛋白質が見出されなくても、本発明のポリペプチドの不活化実験(例えば該遺伝子を過剰発現あるいはノックアウトした組換え動物細胞や組換え動物の作製)からそのポリペプチドの生理作用を解析することにより、本発明のポリペプチドに対するアゴニストまたはアンタゴニストを作製することが可能であり、本発明のポリペプチドに対する特異的結合蛋白質、アゴニストまたはアンタゴニストなどは、各種臓器に関わる疾患の患者の機能不全に関連する疾患の予防あるいは治療薬や診断薬として活用することが可能となる。

[0009] 生体での本発明のポリペプチドの機能の低下または昂進が、各種臓器に関わる疾患の原因となっている場合が考えられる場合がある。この場合には、そのポリペプチド該蛋白質に対するリガンドやリガンド阻害因子、あるいはアンタゴニストやアゴニストの投与だけでなく、そのポリペプチドの各種臓器をターゲットとした本発明のポリペプチドや抗体投与や、そのポリペプチドをコードする遺伝子に対するアンチセンス核酸や同遺伝子配列情報を基に合成した短い2重鎖RNA(RNAi)の投与、あるいは該遺伝子を用いた遺伝子治療に応用することもできる。この場合には本発明のポリペプチドをコードする塩基配列は、本発明のポリペプチドの各種臓器に関わる疾患の患者の遺伝子欠失や変異の有無を調べるために必要な情報であり、本発明のポリペプチドをコードする遺伝子は、本発明のポリペプチドの機能不全に関与する疾患の予防あるいは治療薬や診断薬に応用することができる。

課題を解決するための手段

- [0010] 本発明者は、材料及びスクリーニング方法を今までと全く異なるものを使用することにより鋭意研究を重ねた結果、マウス胎児尾芽由来のcDNAライブラリーから、ヒト KIAA0620遺伝子に高いホモロジーを示す遺伝子(DNA)をクローニングし、その遺伝子がコードするポリペプチドのアミノ酸配列とヒトKIAA0620遺伝子がコードするポリペプチドのアミノ酸配列とでは約91.88%のホモロジーを示す全く新しい1,746アミノ酸長配列であること、また、得られた遺伝子が個体発生時の血管形成時期の初期から血管形成時期全般を通して血管特異的に発現し、成長後の成体では胃・重層扁平上皮に於いて強い発現、子宮に於いてやや強い発現が、また、脳をはじめとした各種臓器に於いて発現が認められることを見出した。
- [0011] また、マウスES細胞を用いた血管形成をモデル化した実験系を用い、血管形成初期の内皮細胞の誕生及びその増殖に関わる遺伝子を網羅的に取得することを可能とする実験系(文献:2,3,14)を使用することによって、今回初めて、血管形成に関わる4,000塩基長以上の齧歯類、とりわけマウス由来の長大な遺伝子として本発明の遺伝子を見出した。
- [0012] 更に、得られた遺伝子情報を解析することにより、本発明のポリペプチド配列は、Plexinファミリーに特徴的なドメインが存在することを発見し、それらのドメインが血管形成時の、あるいは各種組織を構成する細胞の増殖・分化、ガイダンスといった重要な機能に係わっていることを示し、更にその遺伝子情報をもとに新規ポリペプチドとそれに特異的な抗体を得た。更に、ヒト又はマウスKIAA0620遺伝子がコードするタンパク質の膜外部分を規定する領域が、血管新生の阻害、特に、網膜血管網の正常な構築を阻害することを見出した。以上の知見に基づき本発明を完成するに至った。
- [0013] 即ち、本発明は第一の態様として、以下の(a)又は(b)のポリペプチドをコードする塩基配列から成るDNA: (a)配列番号:1、配列番号:15又は配列番号:18で示されるアミノ酸配列と同一又は実質的に同一のアミノ酸配列の一部(例えば、以下に示す新規Plexinファミリー様のもの、配列番号1で示されるアミノ酸配列において2番目(メチオニン)〜1,746番目(アラニン)の1,745個のアミノ酸から成るポリペプチド、又は、配列番号15で示されるアミノ酸配列において2番目(メチオニン)〜1,997番目(アラニン)の1,996個のアミノ酸から成るポリペプチド)又は全部から成るポリペプチド;又は

(b) 配列番号:1、配列番号:15又は配列番号:18で示されるアミノ酸配列において、一部のアミノ酸が欠失、置換又は付加されたアミノ酸配列から成り、(a)のポリペプチドの一部又は全部と実質的に同質の生物学的活性を有するポリペプチドに係る。

本発明の第二の態様として、以下の(a)、(b)又は(c)のDNA: (a) 配列番号:2、配列番号16又は配列番号19で示される塩基配列において、配列番号:1で示されるアミノ酸配列(配列番号:2の塩基対第3-5,240番目の5,238塩基対長)、配列番号:15で示されるアミノ酸配列(配列番号:16の塩基対第3-5,993番目の5,991塩基対長)、又は配列番号18で示されるアミノ酸配列及びそれらの一部(例えば、以下に示す新規Plexin配列に認められるモチーフの少なくとも一つを有するもの、又は、配列番号1で示されるアミノ酸配列において2番目(メチオニン)-1,746番目(アラニン)の1,745個のアミノ酸から成るポリペプチド、又は配列番号15で示されるアミノ酸配列において2番目(メチオニン)-1,997番目(アラニン)の1,996個のアミノ酸から成るポリペプチド)又は全部をコードするDNA; (b) (a)のDNAと相補的な塩基配列からなるDNAとストリンジェントな条件下でハイブリダイズするDNA; 又は(c) (a)のDNAと相補的な塩基配列からなるDNAとストリンジェントな条件下でハイブリダイズし、(a)のポリペプチドの一部又は全部と実質的に同質の生物学的活性を有する蛋白質をコードするDNAに係る。

以上の本発明の第一及び第二の態様であるDNAをまとめて、以下、「本発明のDNA」ともいう。本発明のDNAは、新規ポリペプチドをコードするものである。又、本発明はこれらDNAを含む、ラット、マウスあるいはハムスター等の齧歯類由来遺伝子、特にマウス遺伝子にも係る。特に、このようなマウス遺伝子は「マウス(m) KIAA0620遺伝子」又は「mpf00920遺伝子」ともいう。

更に、本発明は本発明のDNA又は遺伝子(以下、「KIAA0620遺伝子」ともいう。)にコードされるポリペプチド(以下、「本発明のポリペプチド」ともいう。)、例えば、本発明のDNA又は遺伝子を導入した宿主細胞で作製される組換え蛋白質であるポリペプチド(以下、「KIAA0620蛋白質」ともいう)に係る。それらは齧歯類における個体発生時の血管内皮細胞(Flk-1陽性細胞:文献1,10,12,14)、又は血管内皮細胞の前駆細胞から血管内皮細胞に分化する途中の細胞の新規な分子マーカーとして有用で

ある。或いは、本発明のポリペプチドは、血管新生に関わるバイオマーカー、抗体作製に必要なアミノ酸配列、血管新生阻害剤等を提供するものとして有用である。

また、本発明は、本発明のDNA又は遺伝子を含む組換えベクター、及び、本発明のポリペプチド若しくはその部分ペプチド(例えば、以下の実施例に示すような、C-末端領域にある数個数十個のアミノ酸配列からなるポリペプチド)、又は該ポリペプチドを含む組換え蛋白質を又はそれらの塩に特異的に結合する抗体に係る。

[0014] また、本発明のDNA、遺伝子、ポリペプチド若しくは組換え蛋白質、又は抗体を用いることによって、本発明のポリペプチドや組換え蛋白質と特異的に結合する物質(リガンド)やリガンド阻害因子、該蛋白質の発現量を変化させる化合物、該蛋白質に結合する蛋白質との結合性を変化させる化合物(アンタゴニスト、アゴニスト)のスクリーニング方法、該スクリーニング用キットを提供する。

[0015] 更に、本発明の組換えベクターを導入した遺伝子導入細胞、又は遺伝子導入動物を作製し、in vitroまたはin vivo病態モデルを提供する。

[0016] 更に、本発明のDNA、遺伝子、ポリペプチド若しくは組換え蛋白質を、組換え動物若しくは組換え動物細胞、又は、抗体を用いた、血管増殖分化制御因子、あるいは制御化合物(合成化合物を含む)のスクリーニング方法、及び該スクリーニング用の各種キットを提供する。

即ち、本発明のDNA又は遺伝子を用いた、血管増殖分化制御因子又は制御化合物のスクリーニング方法、及び該方法に用いる遺伝子発現測定キット;本発明のポリペプチド若しくは組換え蛋白質を用いて作製した蛋白質相互作用検出系又はアゴニスト・アンタゴニスト・生体内リガンド検索系に基づく、血管増殖分化制御因子又は制御化合物のスクリーニング方法、及び方法に用いるポリペプチド結合物質測定キット;組換え動物若しくは組換え動物細胞を用いた、血管増殖分化制御因子又は制御化合物のスクリーニング方法、及び該方法に用いる血管増殖分化制御活性測定キット;更に、本発明の抗体を用いて作製した蛋白質相互作用検出系、アゴニスト・アンタゴニスト・生体内リガンド検索系に基づく、血管増殖分化制御因子又は制御化合物のスクリーニング方法、及び該方法に用いる抗体力測定キット等も提供する。

[0017] 更に、本発明は、本発明のDNA、本発明のDNAを含有する組換えベクター又は

発現ベクター、該ベクターを保持する形質転換体、該形質転換体を培養し、本発明のポリペプチドの一部あるいは全長のポリペプチドを含む組換え蛋白質を生成、蓄積せしめ、これを採取することを特徴とする、本発明のポリペプチド若しくは該ポリペプチドを含む組換え蛋白質、又はその塩の製造方法、及び、こうして得られる本発明のポリペプチドの一部あるいは全長のポリペプチドを含む組換え蛋白質またはその塩を提供する。又、本発明は、本発明のDNAを含有してなる医薬、本発明のポリペプチド若しくはその部分ペプチド又は該ポリペプチドを含む組換え蛋白質をコードするDNAに実質的に相補的な塩基配列を有するアンチセンスヌクレオチド、又はそれら含有してなる医薬、本発明のDNAの配列情報を基に合成した短い2重鎖RNA(RNAi)又はそれら含有してなる医薬、本発明のポリペプチド若しくはその部分ペプチド又は該ポリペプチドを含む組換え蛋白質を含有してなる医薬を提供する。

- [0018] 更に、本発明は、本発明DNA、本発明ポリペプチド、その部分ポリペプチド若しくは該ポリペプチドを含む組換え蛋白質、又は、本発明のDNA又は遺伝子に対する抗体を網羅的に作成し、それらを集積させて得られる、所謂、DNAチップ(アレイ)、プロテインチップにも係る。

### 発明の効果

- [0019] 今回、本発明者はマウス胎児尾芽由来のcDNAライブラリーを使用し、特別なスクリーニング法を適用することにより、今までに取得不可能であったヒトKIAA0620遺伝子に高いホモロジーを示す遺伝子(DNA)をクローニングし、新規PlexinポリペプチドをコードするDNA配列を取得することに成功した。その新規DNA配列にコードされるポリペプチドは1,746アミノ酸長又は1,997アミノ酸長であり、また、そのポリペプチドは、Semaphorin/CD100 antigenドメイン、3つのPlexin/Semaphorin/integrinドメイン、及び3つのCell surface receptor IPT/TIGを有し、かつC-末端側に膜貫通(TM)セグメントが存在する今までにない構成であり、血管内皮胞の増殖、分化あるいは機能の発現といった細胞の重要なプロセスに関係することが推定された。

又、本発明の遺伝子配列は、個体発生時の血管形成時期の初期から血管形成時期全般を通して血管特異的に発現し、成長後の成体では胃・重層扁平上皮に於いて強い発現、子宮に於いてやや強い発現が、また脳をはじめとする各種臓器に於いて

て発現していることが今回初めて見出され、本発明の遺伝子がコードするポリペプチドが血管新生において、あるいは脳をはじめとする各種臓器において、発育、機能保全、更に各種臓器における血管新生が関係する疾患に関わる重要な働きに関わっている可能性が示された。

- [0020] 更に、脳をはじめとした各種臓器に於いて発現が認められるマウスKIAA0620タンパク質の膜外部分に相当する新規ポリペプチドが、血管新生の阻害、特に、網膜血管網の正常な構築を阻害することを見出した。即ち、組換えPlexinが膜蛋白質であること、更にその膜外領域を発現させて得た組換えPlexin膜外領域が血管新生を阻害することを、哺乳動物細胞を宿主とした遺伝子組換え法による所望蛋白質取得とそれを投与すると新生仔ICRマウス網膜血管網の正常な構築を阻害することが見出され、組換えPlexin膜外領域の網膜血管新生に関わる機能に関わる知見を得た。

#### 図面の簡単な説明

- [0021] [図1]本発明の新規Plexinポリペプチドに認められたSemaphorin/CD100 antigenドメイン、3つのPlexin/Semaphorin/integrinドメイン、3つのCellsurface receptor IPT/TIGドメイン、及び膜貫通(TM)セグメントを示す(aa: アミノ酸配列で数字はアミノ酸数、ボックス: 上から、HMMPfam検索法、HMMSmart検索法、またSosui検索法といった異なった検索法にて同定したドメインと膜貫通(TM)セグメントを示す。これらの結果から、HMMPfam検索法、HMMSmart検索法、またSosui検索法により、新規Plexinポリペプチドを新たに同定した。

[図2A]ホールマウントin situ 法によるmpf00920(マウスKIAA0620)遺伝子のマウス各発生段階10. 5d.p.c.における発現部位を示す。センスプローブによる陰性コントロールによる検出像を示す(血管にそった濃染部位が発現部位)。

[図2B]ホールマウントin situ 法によるmpf00920(マウスKIAA0620)遺伝子のマウス各発生段階10. 5d.p.c.における発現部位を示す。アンチセンスプローブによるmpf00920遺伝子の発現強度を示す(血管にそった濃染部位が発現部位)。

[図2C]ホールマウントin situ 法によるmpf00920(マウスKIAA0620)遺伝子のマウス各発生段階8 d. p. cにおける発現部位を示す(血管にそった濃染部位が発現部位)

。

[図2D]ホールマウントin situ 法によるmpf00920(マウスKIAA0620)遺伝子のマウス各発生段階9. 5d. p. cにおける発現部位を示す(血管にそって濃染部位が認められる)。

[図3A]受精後14.5日目胎仔の矢状方向(sagittal)凍結切片について、in situ 法によるmpf00920(マウスKIAA0620)遺伝子の発現部位を示す。上はセンスプローブによる陰性コントロールによる検出像を示し、下はアンチセンスプローブによるmpf00920遺伝子の発現強度を示す(濃染部位が発現部位)。

[図3B]アンチセンスプローブによるmpf00920遺伝子の発現強度の脳の強拡大した検出像を示す(濃染部位が発現部位)。

[図4A]成体における胃のパラフィン切片について、in situ 法によるmRNAレベルでのmpf00920(マウスKIAA0620)遺伝子の発現部位を示す。胃の重層扁平上皮濃染部位が濃染されている。

[図4B]成体における大腦のパラフィン切片について、in situ 法によるmRNAレベルでのmpf00920(マウスKIAA0620)遺伝子の発現部位を示す。大腦の神経膠細胞が濃染されている。

[図4C]成体における小腦のパラフィン切片について、in situ 法によるmRNAレベルでのmpf00920(マウスKIAA0620)遺伝子の発現部位を示す。小腦のプルキンエ細胞層が濃染されている。

[図5]RT-PCR法によるマウスKIAA0620遺伝子のマウス胎仔発生過程に於けるmRNAレベルでの発現頻度の比較を示す電気泳動の写真である。上段はコントロールとして用いたFlk1遺伝子の発現強度、下段はマウスKIAA0620遺伝子の発現強度を、アガロース電気泳動で分画した後のエチジウムブロミド染色パターンについて示す。

[図6]ウサギポリクローナル抗体を用いたウエスタンブロット法によるHEK293 細胞を宿主とするlacZ-V5融合蛋白質(lacZ-V5 proteins)及びマウスKIAA0620-V5融合蛋白質(mKIAA0620-cds-V5 proteins)の検出の結果を示すメンブレンフィルターの写真である。図中、M: high range marker、1: HEK293 total proteins、2: lacZ-V5 proteins、3: mKIAA0620-cds-V5 proteins(以上の1-4レーンは抗V5-HRP抗体による染色)、4: HEK293 total proteins、5: lacZ-V5 proteins、6: mKIAA0620-cds-V5

proteins、7: HEK293 total proteins、8: lacZ-V5 proteins、9: mKIAA0620-cds-V5 proteins、(以上の5〜8レーンは抗mKIAA0620抗体による染色)を夫々示す。尚、図中の数値は希釈倍率を示す。

[図7]in situ ハイブリダイゼーション法を用いた新生仔網膜血管におけるマウス KIAA0620遺伝子発現の検出の結果を示す顕微鏡の写真である(図左:生後2日目、中央:4日目、右:7日目;血管新生にそって濃染部位が認められる)。

[図8]HEK293細胞を宿主として、マウスKIAA0620全長-V5融合蛋白質、及び膜貫通領域(TM)を含むマウス膜外領域、すなわちマウスKIAA0620膜外領域(TM)-V5融合蛋白質を発現せしめ、全蛋白質画分を抽出したもの、及び該全蛋白質画分から疎水性蛋白質を抽出したものをウエスタンブロット法を用いた解析した結果を示す写真である。図中、1. はコントロール細胞から調製した全蛋白質画分、2.はコントロール細胞から調製した疎水性蛋白質画分、3.はマウスKIAA0620全長-V5融合蛋白質発現細胞から調製した全蛋白質画分、4.はマウスKIAA0620全長-V5融合蛋白質発現細胞から調製した疎水性蛋白質画分、5.はマウスKIAA0620膜外領域(TM)-V5融合蛋白質発現細胞から調製した全蛋白質画分、6.はマウスKIAA0620膜外領域(TM)-V5融合蛋白質を発現から調製した疎水性蛋白質画分の解析結果を示す。尚、左の写真は発色法による検出像を示し、右の写真は化学発光法による検出像を示し、中央のラダーと数値(kDa)はサイズマーカーとそれによる分子量を表す。

[図9]マウスKIAA0620膜外部分-IgG1Fc融合蛋白質を用いた新生仔マウス網膜血管発生の阻害実験(生後5日目投与5時間後)の結果を示す顕微鏡の写真である。眼球注射5時間後には、発達途上の網膜血管、特に血管新生先端部の内皮細胞において過剰な糸状足形成が認められた(図左下、右下:mKIAA0620膜外部分-Fc)。これに対し、IgG1Fc蛋白質単独の眼内注射では全く変化がみられなかった(図左上、右上:Fc)。

[図10]マウスKIAA0620膜外部分-IgG1Fc融合蛋白質を用いた新生仔マウス網膜血管発生の阻害実験(生後1日目投与3日後)の結果を示す顕微鏡の写真である。眼球注射3日後には、網膜血管網の正常な構築が著しい障害が認められた(図右:mKIAA0620膜外部分-Fc)。これに対し、IgG1Fc蛋白質単独の眼内注射では全く変化



がみられなかった(図左:Fc)。

### 発明を実施するための最良の形態

- [0022] 本発明のDNAは、本発明者により採取されたマウス胎児尾芽由来mRNAを出発材料として、本発明者が調製したcDNAライブラリーから、cDNA断片として単離した後に、塩基配列を決定し同定したものである。即ち、具体的には、(DNA Research, 2002, 9:47-57、及び Nucreic Acids Res., 29, e22 (2001))に従って調製したマウス胎児尾芽由来のcDNAライブラリーから、約16,608個の組換え体を選択し、その全ての3'末端DNA配列を決定し、その中から、ヒトKIAA0620遺伝子に高い相同性を有するクローンを選択し全塩基配列の決定を行なった。次に、こうして得られた全塩基配列に基づき、DNA解析プログラム(GCG, Fasta& Blast)を用いてホモロジー検索を行ない、その困難性から今までに取得され得なかった本発明のDNAを鋭意検討の結果、ようやく取得するに至った。
- [0023] すなわち、マウス胎児尾芽由来cDNAライブラリーに対し、ヒト長鎖cDNA(KIAA0620)にホモロジーを有する遺伝子取得を試みたところ、驚くべきことにヒトKIAA0620遺伝子がコードするポリペプチドのアミノ酸配列とアミノ酸配列レベルで約91.88%のホモロジーを示す全く新しい1,746アミノ酸長配列(配列番号:1)を有する新規ポリペプチド(本発明のポリペプチド)をコードする新規遺伝子を含む塩基配列(配列番号:2)を有するクローン(クローン名:mpf00920)を取得することに成功した。
- [0024] 本発明の配列番号1で示されるアミノ酸配列(1,746アミノ酸長)の1番目から1,746番目までのアミノ酸配列(1,746アミノ酸長)は、ヒトKIAA0620遺伝子がコードするアミノ酸配列(1,985アミノ酸長)のほぼ全長に近い配列(238番目から1,985番目までの1,748アミノ酸長)に対して約91.88%という有意な相同性を有する。
- [0025] 本発明により得られた上記のアミノ酸配列について、以下の実施例に記載したように、公共のデータベースを用いてホモロジー検索を行った結果、今までに出願された2つの配列に対して「本発明のポリペプチド」の配列の全長1,746アミノ酸長について約91.70%及び約91.51%という比較的高いホモロジーが認められた。しかし、それらはヒト由来配列であり、ヒト病態の解明に重要なモデル動物である齧歯類、とりわけマウスに於けるヒトKIAA0620遺伝子に対応する遺伝子は本発明により初めて取得され

、同遺伝子がコードする「本発明のポリペプチド」配列の解明により、ようやく新規配列蛋白とその機能を述べる事可能となった。

[0026] 尚、配列番号：2に示される塩基配列を有する本発明のDNAを含むプラスミド(プラスミド表示名：mpf00920)は、茨城県つくば市東1丁目1番地1中央第6の独立行政法人産業技術総合研究所特許生物寄託センターに平成15年9月10日付けで寄託され、受託番号FERM P-19518が付されている。該プラスミドは更に、2004年10月 25日付けで、特許手続上の微生物の寄託の国際的承認に関するブダペスト条約に基づく国際寄託に移管され、受領番号FERM ABP-10154が付されている。

[0027] ヒトKIAA0620遺伝子の配列は6,754塩基対長であり、コードされているポリペプチドのアミノ酸配列の長さは1,985アミノ酸である(DNA Research, 1998, 5:169-176, <http://www.kazusa.or.jp/huge/gfpage/KIAA0620/>, NCBI-GenBank Accession No. AB014520)。ヒトKIAA0620遺伝子ホモログを詳細に研究することにより、N-末端側にはさらにポリペプチドがコードされている可能性について検証される可能性がある。本発明の配列番号2に示されるDNAにコードされているポリペプチドのアミノ酸配列の長さは1,746アミノ酸であるが、本発明のDNAに対するホモログについて更に詳細に研究することにより、N-末端側に更に伸張してポリペプチドがコードされていることを見つける可能性がある。

[0028] 尚、当業者であれば、本明細書によって初めて開示された配列番号：2に示した塩基配列に基づいてクローンの5'側に適当なプライマー(例えば、配列番号：2の塩基対第61-80番目5'-CGCCTACCTCGGGCACCGGG-3'に対応させて合成した配列5'-CCCGGTGCCCCGAGGTAGGCG-3')を調製し、該プライマーと市販されている齧歯類由来のmRNA、あるいは齧歯類由来組織から調製したmRNAとハイブリダイゼーションを行なった後に逆転写反応を行なうことにより本発明のDNAの上流側(遺伝子の5'側)の領域を含む新たなcDNA断片を特異的に合成することができる。合成した5'側の領域を含む新たなcDNA断片をプラスミドに挿入した後、配列番号2の一部分をプローブとして、コロニーハイブリダイゼーションのような相同性クローニングによって、本発明のDNAを含む齧歯類由来KIAA0620遺伝子の全領域を調製することが可能である。あるいは他の方法、例えば、本発明のDNAをプローブとして用いれば

、コロニーハイブリダイゼーションのような相同性クローニングによって、マウスを含めた各種齧歯類由来KIAA0620遺伝子の5'末端領域を調製することができる。

[0029] 実際には、本発明者は、長鎖cDNAといった対象テキスト配列が長い材料を哺乳動物のゲノム配列を高速検索することを可能にするために、特開2003-216615号公報に基づくメモリに比較回路を付加した content addressable memory (CAM) を用いた配列の長さに計算時間が依存しない並列比較可能な計算機(ハードウェア)開発とその制御アルゴリズム設計を鋭意研究することにより、超並列ゲノムコンパレータといった改良された新規システムを構築して、長鎖cDNAを対象とした解析方法を完成した。完成した超並列ゲノムコンパレータを使用し、公開済みのマウスゲノム配列からマウスmKIAA0620に対する大規模・高速塩基配列検索を実施し、公開済みのマウスゲノム配列のなかからmKIAA0620塩基配列に対し付加する配列に関わる情報を検索し、本発明の配列番号1に示したアミノ酸配列のN末側に新たに付加されるアミノ酸配列を取得するために必要なプライマー配列を設計するに至った。それらプライマーを使用して5'RACE等のPCR法を使用することによって、本明細書の実施例に具体的に記載したように、N末側に新たに付加される251個の新たなアミノ酸配列を決定することができた。

[0030] 本発明のDNAとしては、前述した本発明のポリペプチドをコードする塩基配列から成るものであればいかなるものであってもよい。各種齧歯類由来の各種臓器、例えば、脳、心臓、肺、肝臓、脾臓、腎臓、精巣、胸腺、筋肉、骨髄等、あるいは発生の各段階の各種組織・細胞に由来するcDNAライブラリー等から同定・単離されたcDNA、又は、合成DNAのいずれでもよい。ライブラリー作成に使用するベクターは、バクテリオファージ、プラスミド、コスミド、ファージミドなどいずれであってもよい。また、前記した細胞・組織、あるいはそれらの細胞質よりtotalRNA画分またはmRNA画分を調製したものを用いて、直接Reverse Transcriptase Polymerase Chain Reaction(以下、「RT-PCR法」と略称する)によって増幅することもできる。

[0031] 配列番号:1、配列番号:15又は配列番号18で示されるアミノ酸配列と実質的に同一のアミノ酸配列とは、配列番号:1、配列番号:15又は配列番号18で示される全アミノ酸配列との相同性の程度が、全体の平均で約92.5%以上、好ましくは約95%

以上、より好ましくは約98%以上であるアミノ酸配列を意味する。従って、本発明の配列番号:1、配列番号:15又は配列番号18で示されるアミノ酸配列と実質的に同一のアミノ酸配列から成るポリペプチドとしては、例えば、前記の配列番号:1、配列番号:15又は配列番号:18で示されるアミノ酸配列に対して上記の相同性を有し、配列番号:1、配列番号:15又は配列番号:18で示されるアミノ酸配列から成るポリペプチドと実質的に同質の生物学的活性を有するポリペプチドを挙げることができる。ここで、実質的に同質とは、それらの活性が性質的に同質であることを示す。又、本発明のポリペプチドには、例えば、配列番号:1、配列番号:15又は配列番号:18で示されるアミノ酸配列中において、一部(好ましくは、1〜20個程度、より好ましくは1〜10個程度、さらに好ましくは数個)のアミノ酸が欠失、置換又は付加したアミノ酸配列、或いはそれらを組み合わせたアミノ酸配列から成り、配列番号:1、配列番号:15又は配列番号:18で示されるアミノ酸配列から成るポリペプチドと実質的に同質の生物学的活性を有するポリペプチドも含まれる。

[0032] 更に、本発明のDNAは、例えば、配列番号:2、配列番号16又は配列番号19で示される塩基配列において、配列番号:1、配列番号:15又は配列番号18で示されるアミノ酸配列をコードするDNA、又は、該DNAと相補的な塩基配列からなるDNAとストリンジントな条件下でハイブリダイズし、好ましくは更に配列番号:1又は配列番号:15で示されるアミノ酸配列から成るポリペプチドと同質の生物学的活性を有するポリペプチド(蛋白質)をコードするDNAであればいずれのものでもよい。かかる条件下で、配列番号:2、配列番号:16又は配列番号:19で示される塩基配列において、配列番号:1、配列番号:15又は配列番号:18で示されるアミノ酸配列をコードするDNAと相補的な塩基配列からなるDNAとハイブリダイズできるDNAとしては、例えば、該DNAの全塩基配列との相同性の程度が、全体の平均で、約87.5%以上、好ましくは約90%以上、より好ましくは約95%以上である塩基配列を含有するDNA等を挙げることができる。ハイブリダイゼーションは、Molecular cloning third.ed. (Cold Spring Harbor Lab.Press, 2001)に記載の方法等、当業界で公知の方法あるいはそれに準じる方法に従って行なうことができる。また、市販のライブラリーを使用する場合、添付の使用説明書に記載の方法に従って行なうことができる。ここで、「ストリンジ

エントな条件」とは、例えば、DIG DNA Labeling (ベーリンガー・マンハイム社製Cat No. 1175033)でプローブをラベルした場合に、32℃のDIG Easy Hyb溶液(ベーリンガー・マンハイム社製Cat No. 1603558)中でハイブリダイズさせ、40℃の0.1xSSC溶液(0.1%[w/v]SDSを含む)中でメンブレンを洗浄する条件(1xSSCは0.15MNaCl, 0.015Mクエン酸ナトリウムである)でのサザンブロットハイブリダイゼーションで本発明ヒトDNAプローブにハイブリダイズする程度の条件である。

[0033] 本発明のDNAのクローニングの手段としては、本発明のポリペプチドの部分等の適当な塩基配列を有する合成DNAプライマーを用いてPCR法によって増幅するか、または適当なベクターに組み込んだDNAを本発明のポリペプチドの一部あるいは全領域をコードするDNA断片もしくは合成DNAを用いて標識したもののハイブリダイゼーションによって選別することができる。ハイブリダイゼーションの方法は、例えば、Molecular cloning third.ed. (Cold Spring Harbor Lab.Press, 2001)に記載の方法などに従って行なうことができる。また、市販のライブラリーを使用する場合、添付の使用説明書に記載の方法に従って行なうことができる。DNAの塩基配列の変換は、公知のキット、例えば、SuperScript II逆転写酵素キット(ギブコBRL社)等を用いて、Gapped duplex法やKunkel法などの公知の方法あるいはそれらに準じる方法に従って行なうことができる。クローン化されたポリペプチドをコードするDNAは目的によりそのまま、または所望により制限酵素で消化したり、リンカーを付加したりして使用することができる。該DNAはその5'末端側に翻訳開始コドンとしてのATGを有し、また3'末端側には翻訳終止コドンとしてのTAA、TGAまたはTAGを有していてもよい。これらの翻訳開始コドンや翻訳終止コドンは、適当な合成DNAアダプターを用いて付加することもできる。

[0034] 本発明のポリペプチドの発現ベクターは、当該技術分野で公知の方法に従って作成することができる。例えば、(1)本発明のDNA又は本発明のDNAを含む齧歯類由来遺伝子を含有するDNA断片を切り出し、(2)該DNA断片を適当な発現ベクター中のプロモーターの下流に連結することにより製造することができる。発現ベクターとしては、大腸菌由来のプラスミド(例、pBR322, pBR325, pUC18, pUC118)、枯草菌由来のプラスミド(例、pUB110, pTP5, pC194)、酵母由来プラスミド(例、p

SH19, pSH15)、 $\lambda$ ファージなどのバクテリオファージ、あるいはSV40、CMVウイルス、レトロウイルス、ワクシニアウイルス、パキユロウイルス、ウシパピローマウイルスなどの動物ウイルス由来配列を使用した発現ベクター等を利用することができる。本発明で用いられるプロモーターとしては、遺伝子の発現に用いる宿主に対応した適切なプロモーターであればいかなるものでもよい。例えば、宿主が大腸菌である場合は、trpプロモーター、lacプロモーター、recAプロモーター、 $\lambda$  PLプロモーター、lppプロモーター、T7プロモーター、あるいはそれらプロモーターを組み合わせまたは複合させたプロモーターなどが、宿主が枯草菌である場合は、SPO1プロモーター、SPO2プロモーター、penPプロモーターなど、宿主が酵母である場合は、PHO5プロモーター、PGKプロモーター、GAPプロモーター、ADHプロモーターなどが好ましい。動物細胞を宿主として用いる場合は、SR $\alpha$ プロモーター、SV40プロモーター、LTRプロモーター、CMVプロモーター、HSV-TKプロモーター、HSPプロモーター、メタロチオネインプロモーターなどが挙げられる。

[0035] 発現ベクターには、以上の他に、所望により当該技術分野で公知の、エンハンサー、スプライシングシグナル、ポリA付加シグナル、選択マーカー、SV40複製オリジン(以下、SV40oriと略称する場合がある)等を付加することができる。また、必要に応じて、本発明のDNAにコードされた蛋白質を他の蛋白質(例えば、グルタチオンSトランスフェラーゼ、ヒスチジンタグ、カルモデュリンバインディング蛋白質、及びプロテインA等)との融合蛋白質として発現させることも可能である。このような融合蛋白質は、適当なプロテアーゼを使用して切断し、それぞれの蛋白質に分離することができる。

[0036] 更に、組換え動物細胞を作成することを目的とした動物細胞をターゲットとした遺伝子導入用発現ベクターには、以上の他に、所望により当該技術分野で公知の、Bluescript SK(+/-)ベクターを鋳型に血管内皮細胞特異的発現を目的にしたTie2プロモーター(血管内皮細胞特異的プロモーター)を連結したものを利用するとよい。それら発現ベクターとプロモーターを使用することで血管内皮細胞特異的発現が可能となる。或いは、Gateway (商標)クローニングテクノロジー (Invitrogen: Cat.No.11821-014) として知られているクローニングシステムを利用することも出来る。

[0037] 宿主細胞としては、例えば、エシェリヒア属菌、バチルス属菌、酵母、昆虫細胞、昆虫、動物細胞などが用いられる。エシェリヒア属菌の具体例としては、エシェリヒア・コリ (*Escherichia coli*) K12由来のDH1 (Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 60巻, 160(1968)), JM103 (Nucleic Acids Research, 9巻, 309(1981)), JA221 (Journal of Molecular Biology, 120巻, 517(1978)), 及びHB101 (Journal of Molecular Biology, 41巻, 459(1969))、あるいはエシェリヒア・コリ (*Escherichia coli*) B株等が用いられる。バチルス属菌としては、例えば、バチルス・サチルス (*Bacillus subtilis*) M1114 (Gene, 24巻, 255(1983)), 207-21 [Journal of Biochemistry, 95巻, 87(1984)] 等が用いられる。酵母としては、例えば、サッカロマイセス セレビシエ (*Saccharomyces cerevisiae*) AH22, AH22R-, NA87-11A, DKD-5D, 20B-12、シゾサッカロマイセス ポンベ (*Schizosaccharomyces pombe*) NCYC1913, NCYC2036、ピキア パストリス (*Pichia pastoris*) 等が用いられる。動物細胞としては、例えば、サル腎臓細胞由来COS-1, COS-7, Vero細胞, チャイニーズハムスターCHO細胞 (以下、CHO細胞と略記), dhfr遺伝子欠損チャイニーズハムスター細胞CHO (以下、CHO (dhfr-)細胞と略記), マウスL細胞, マウスAtT-20, マウスミエローマ細胞, ラットGH3細胞, HEK293T細胞、ヒトFL細胞、ヒトHela細胞あるいはヒトミエローマ細胞などが用いられる。

[0038] また、組換え動物細胞を作成することを目的とした動物細胞をターゲットとした遺伝子導入用の細胞としては例えば、培養マウスES細胞、マウス受精卵、マウスNIH3T3細胞株、ヒト胎仔腎細胞由来293細胞株などが用いられる。

[0039] これら宿主細胞の形質転換は、当該技術分野で公知の方法に従って行うことができる。例えば、以下に記載の文献を参照することができる。Proc. Natl. Acad. Sci. USA (69巻、2110-、1972)、Gene (17巻、107-、1982)、Molecular & General Genetics (168巻、p111-、1979)、Methods in Enzymology (194巻、p182-187、1991)、Proc. Natl. Acad. Sci. USA (75巻、1929-、1978)、細胞工学別冊8 新細胞工学実験プロトコール (p263-267、1995、秀潤社発行)、及びVirology (52巻、456-、1973)。

[0040] 更に、遺伝子導入動物の形質転換を目的とした宿主動物細胞の形質転換は、当

該技術分野で公知の方法に従って行うことができる。例えば、以下に記載の文献を参照することができる。Proc. Natl. Acad. Sci. USA (77巻、p7380-7384、1980)、別冊実験医学・ジーンターゲイングの最新技術(p34-41、2000、羊土社発行)、マウス操作マニュアル第二版(p225-252、p279-285、1994、近代出版発行)、増刊実験医学・発生工学実験法(全196頁、1994、羊土社発行)、及びTrend in Genetics (5巻、p70-76、1989)

[0041] 具体的には、トランスジェニックマウス作製においては、マイクロインジェクション法を用いる。採卵用のマウス(マウス系統C57BL/6、C3H、BDF1)に妊馬血清(5単位)の腹腔内投与、その48時間後ヒト絨毛性ゴナドトロピン(5単位)の腹腔内投与を行い、排卵誘発を行う。ホルモン注射後14時間後に排卵が起こるので、その間に雄マウスと交尾させる。雌の膣栓の有無で交尾の確認後に雌マウスを屠殺し、卵管膨大部から受精卵を採取する。採取した受精卵は、培養液の入ったペトリ皿に移し、顕微鏡下でマイクロマニピュレーターを用いて受精卵の前核中に目的遺伝子を注入する。目的遺伝子注入後、生き残った受精卵は、偽妊娠マウスの卵管内に移入する。受精卵移入後、約20日後に新生仔(トランスジェニックマウス)が得られる。

[0042] また、ノックアウトマウス作製には、培養マウスES細胞に電気穿孔法で目的遺伝子を導入し、標的遺伝子相同組換えを起こした細胞を選択した後に、このES細胞を他の胚盤胞内に注入したものを仮親の卵管内へ移入し、キメラマウスを作製する。この方法では、まず遺伝子導入されていないES細胞または導入されているがランダムに入ったES細胞から相同組換えを起こしたES細胞を選別する必要があり、このための選択マーカー遺伝子としてネオマイシン耐性遺伝子を利用する。この遺伝子は相同領域間に挿入する。相同組換えの成否は、サザンブロット法とPCR法でDNA断片が検出できるか確認する。あるいは、他の手法としてポジティブ・ネガティブ選択法が利用できる。この場合には前者と異なり、ネオマイシン耐性遺伝子にプロモーターを付加する必要がある。ランダムに組み込んだ細胞との選別のため、第二の選択マーカー遺伝子として、ヘルペスウイルス由来チミジンキナーゼ遺伝子やジフテリア毒素フラグメントA遺伝子を利用する。標的遺伝子の相同組換え細胞以外はガンシクロビル添加またはジフテリア毒素フラグメントAの発現により殺すことが可能である。培養10



日目程度でコロニーが明瞭になれば、サザンブロット法またはPCR法で相同組換えを起こしたクローンを同定する。同定したES細胞クローンは、レシピエントの胚盤胞中にマイクロインジェクションで注入後、仮親の子宮内へ移入する。移入後、約20日後に新生仔(生殖キメラマウス)が得られる。

- [0043] このようにして得られた、本発明のDNAを含む齧歯類由来遺伝子を含有する発現ベクターで形質転換された形質転換体は、当該技術分野で公知の方法に従って培養することができる。例えば、宿主がエシェリヒア属菌の場合、培養は通常約15〜43℃で約3〜24時間行ない、必要により、通気や攪拌を加えることもできる。宿主がバチルス属菌の場合、培養は通常、約30〜40℃で約6〜24時間行ない、必要により通気や攪拌を加えることもできる。宿主が酵母である形質転換体を培養する際、培養は通常、pH約5〜8に調整された培地を用いて約20〜35℃で約24〜72時間行ない、必要に応じて通気や攪拌を加えることもできる。宿主が動物細胞である形質転換体を培養する際、pHは約6〜8に調整された培地を用いて、通常約30〜40℃で約15〜60時間行ない、必要に応じて通気や攪拌を加えることもできる。

- [0044] 上記培養物から本発明のポリペプチドを分離精製するには、例えば、培養後、公知の方法で菌体あるいは細胞を集め、これを適当な緩衝液に懸濁し、超音波、リゾチームおよび／または凍結融解などによって菌体あるいは細胞を破壊したのち、遠心分離やろ過により蛋白質の粗抽出液を得る。緩衝液の中に尿素や塩酸グアニジンなどの蛋白質変性剤や、トリトンX-100<sup>TM</sup>などの界面活性剤が含まれていてもよい。培養液中に蛋白質が分泌される場合には、培養終了後、公知の方法で菌体あるいは細胞と上清とを分離し、上清を集める。このようにして得られた培養上清、あるいは抽出液中に含まれる蛋白質の精製は、公知の分離・精製法を適切に組み合わせて行なうことができる。こうして得られた本発明のポリペプチド(蛋白質)は、公知の方法あるいはそれに準じる方法によって塩に変換することができ、逆に塩で得られた場合には公知の方法あるいはそれに準じる方法により、遊離体または他の塩に変換することができる。更に、組換え体が産生する蛋白質を、精製前または精製後に、メチオニンアミノペプチダーゼを用いてN-末端メチオニンを除去したり、ミリストイル転移酵素を用いてN-末端アミノ酸のミリストイル化を行ったり、アセチルトランスフェラーゼを用いてN

ー末端アミノ酸のアセチル化を行ったり、或いはその他の修飾酵素を用いることにより任意にアミノ酸の修飾を行うことができる。又、C-末端を修飾するプロセシングカルボキシルペプチダーゼ、C-末端アミド化酵素等を作用させてC-末端アミノ酸を修飾することもできる。更に、トリプシン、キモトリプシン、FactorXa、トロンビン、又は、KEX2プロテアーゼのような適当な蛋白限定分解酵素を作用させることにより、ポリペプチドを部分的に除去することもできる。

融合蛋白質として産生させた場合には、適当な蛋白限定分解酵素を用いて不必要なポリペプチド部分を除去することもできる。

本発明ポリペプチド(蛋白質)又はその塩の存在は、様々な結合アッセイ及び特異抗体を用いたエンザイムイムノアッセイ等により測定することができる。

[0045] 本発明のポリペプチド(蛋白質)は、C-末端が通常カルボキシル基( $-\text{COOH}$ )またはカルボキシレート( $-\text{COO}^-$ )であるが、C-末端がアミド( $-\text{CONH}_2$ )またはエステル( $-\text{COOR}$ )であってもよい。ここでエステルにおけるRとしては、例えば、メチル、エチル、*n*-プロピル、イソプロピルもしくは*n*-ブチルなどのC1-6アルキル基、例えば、シクロペンチル、シクロヘキシルなどのC3-8シクロアルキル基、例えば、フェニル、 $\alpha$ -ナフチルなどのC6-12アリール基、例えば、ベンジル、フェネチルなどのフェニル-C1-2アルキル基もしくは $\alpha$ -ナフチルメチルなどの $\alpha$ -ナフチル-C1-2アルキル基などのC7-14アラルキル基のほか、経口用エステルとして汎用されるピバロイルオキシメチルエステルなどが用いられる。

[0046] 本発明のポリペプチド(その存在状態は蛋白質である)がC-末端以外にカルボキシル基(またはカルボキシレート)を有している場合、カルボキシル基がアミド化またはエステル化されているものも本発明の蛋白質に含まれる。この場合のエステルとしては、例えば上記したC-末端のエステルなどが用いられる。さらに、本発明の蛋白質には、N-末端のメチオニン残基のアミノ基が保護基(例えば、ホルミル基、アセチル基などのC1-6アシル基など)で保護されているもの、生体内で切断されて生成するN-末端のグルタミン酸残基がピログルタミン化したもの、分子内のアミノ酸の側鎖上にある、例えばOH、 $\text{COOH}$ 、 $\text{NH}_2$ 、SHなどが適当な保護基(例えば、ホルミル基、アセチル基などのC1-6アシル基など)で保護されているもの、あるいは糖鎖が結合した

いわゆる糖蛋白質などの複合蛋白質なども含まれる。

[0047] 本発明のポリペプチドの一部からなるペプチドとしては、前記した本発明のポリペプチド(その存在状態は蛋白質である)の部分ペプチドであって、実質的に同質の活性を有するものであればいずれのものでもよい。例えば、本発明のポリペプチド(蛋白質)の構成アミノ酸配列のうち少なくとも20個以上、好ましくは50個以上、さらに好ましくは70個以上、より好ましくは100個以上、最も好ましくは200個以上のアミノ酸配列を有し、例えば、本発明の組換え蛋白質と実質的に同質の生物学的活性を有するペプチドなどが用いられる。このような部分ペプチドの具体例としては、配列番号:1で示されるアミノ酸配列の中の、新規Plexinに特徴的なモチーフを含むもの、又は、配列番号1で示されるアミノ酸配列において2番目(メチオニン)〜1,746番目(アラニン)の1,745個のアミノ酸から成るポリペプチドを挙げることができる。又、本発明の部分ペプチドはC-末端が通常カルボキシル基( $-\text{COOH}$ )またはカルボキシレート( $-\text{COO}^-$ )であるが、前記した本発明の蛋白質のごとく、C末端がアミド( $-\text{CONH}_2$ )またはエステル( $-\text{COOR}$ )であってもよい。さらに、本発明の部分ペプチドには、前記した本発明の蛋白質と同様に、N-末端のメチオニン残基のアミノ基が保護基で保護されているもの、N-末端側が生体内で切断され生成したグルタミル基がピログルタミン酸化したもの、分子内のアミノ酸の側鎖上の置換基が適当な保護基で保護されているもの、あるいは糖鎖が結合したいわゆる糖ペプチドなどの複合ペプチドなども含まれる。

[0048] 本発明のポリペプチド(その存在状態は蛋白質である)又はその一部からなるペプチドの塩としては、とりわけ生理学的に許容される酸付加塩が好ましい。この様な塩としては、例えば、無機酸(例えば、塩酸、リン酸、臭化水素酸、硫酸)との塩、あるいは有機酸(例えば、酢酸、ギ酸、プロピオン酸、フマル酸、マレイン酸、コハク酸、酒石酸、クエン酸、リンゴ酸、蔞酸、安息香酸、メタンスルホン酸、ベンゼンスルホン酸)との塩などが用いられる。

[0049] 本発明のポリペプチド(その存在状態は蛋白質である)、その一部からなるペプチドもしくはそれらの塩またはそれらのアミド体は、当該技術分野で公知の化学合成方法を用いて調製することもできる。例えば、通常市販されている蛋白質合成用樹脂を用

い、 $\alpha$ -アミノ基と側鎖官能基を適当に保護したアミノ酸を、目的とする蛋白質の配列通りに、当業界において自体公知の各種縮合方法に従い、樹脂上で縮合させる。反応の最後に樹脂から蛋白質を切り出すと同時に各種保護基を除去し、さらに高希釈溶液中で分子内ジスルフィド結合形成反応を実施し、目的の蛋白質、その部分ペプチドまたはそれらのアミド体を取得する。上記した保護アミノ酸の縮合に関しては、例えば、DCC、N,N'-ジイソプロピルカルボジイミド、及びN-エチル-N'-(3-ジメチルアミノプロリル)カルボジイミドのようなカルボジイミド類に代表される蛋白質合成に使用できる各種活性化試薬を用いることができる。これらによる活性化にはラセミ化抑制添加剤(例えば、HOBt, HOOBt)とともに保護アミノ酸を直接樹脂に添加するかまたは、対照とする酸無水物またはHOBtエステルあるいはHOOBtエステルとしてあらかじめ保護アミノ酸の活性化を行なった後に樹脂に添加することができる。

[0050] 保護アミノ酸の活性化や樹脂との縮合に用いられる溶媒としては、酸アミド類、ハロゲン化炭化水素類、アルコール類、スルオキシド類、及びエーテル類等、当業界において蛋白質縮合反応に使用しうることが知られている溶媒から適宜選択されうる。反応温度は蛋白質結合形成反応に使用され得ることが知られている範囲から適宜選択され、通常約-20〜50℃の範囲から適宜選択される。活性化されたアミノ酸誘導体は通常1.5〜4倍過剰で用いられる。ニンヒドリン反応を用いたテストの結果、縮合が不十分な場合には保護基の脱離を行うことなく縮合反応を繰り返すことにより十分な縮合を行なうことができる。反応を繰り返しても十分な縮合が得られないときには、無水酢酸またはアセチルイミダゾールを用いて未反応アミノ酸をアセチル化して、後の反応に影響を及ぼさないようにすることができる。原料の各アミノ基、カルボキシル基、及びセリン水酸基等の保護基としても、当該技術分野において、通常使用される基を使用することができる。原料の反応に関与すべきでない官能基の保護ならびに保護基、およびその保護基の脱離、反応に関与する官能基の活性化などは公知の基または公知の手段から適宜選択しうる。

[0051] 本発明の一部からなるペプチドまたはそれらの塩は、当該技術分野において自体公知のペプチドの合成法に従って、あるいは本発明の蛋白質を適当な蛋白質限定分解酵素で切断することによって製造することができる。ペプチドの合成法としては、

例えば、固相合成法、液相合成法のいずれによっても良い。公知の縮合方法や保護基の脱離としては、例えば、以下の(1)～(3)に記載された方法が挙げられる。

(1) 泉屋信夫他、ペプチド合成の基礎と実験、丸善(株) (1975年)

(2) 矢島治明 および榊原俊平、生化学実験講座1、蛋白質の化学IV、205、(1977年)

(3) 矢島治明監修、続医薬品の開発 第14巻 ペプチド合成 広川書店。

又は、一部からなるペプチドは、例えば、C-末端から十数残基の配列或いは配列番号:1で示されるアミノ酸配列の任意の場所の十数残基の部分を知のペプチド合成装置等を用いて合成することができる。更に、このような部分ペプチドは例えば約50から500アミノ酸長までの長さの適当な部位のポリペプチド、または約500アミノ酸長から全長までの長さの適当な場部位のポリペプチドを選択して、組換え蛋白質として前述の遺伝子組換え技術を用いて製造しても良い。

[0052] 反応後の精製も自体公知の方法、例えば、溶媒抽出・蒸留・カラムクロマトグラフィー・液体クロマトグラフィー・再結晶などを組み合わせて本発明の部分ペプチドを精製単離することができる。上記方法で得られる部分ペプチドが遊離体である場合は、公知の方法によって適当な塩に変換することができるし、逆に塩で得られた場合は、公知の方法によって遊離体に変換することができる。

[0053] 本発明のポリペプチド(その存在状態は蛋白質である)、その一部からなるペプチドまたはそれらの塩と特異的に結合する抗体は、それらを特異的に認識し得るものであれば、ポリクローナル抗体、モノクローナル抗体の何れであってもよい。本発明のポリペプチド(蛋白質)、その部分ペプチドまたはそれらの塩に対する抗体は、本発明のポリペプチド(蛋白質)又はその部分ペプチドを抗原として用い、当業者に公知の抗体または抗血清の製造法に従って製造することができる。このように免疫原として使用できる部分ペプチドの例として、本明細書の実施例に具体的に記載されているように、配列番号1に示される本発明ポリペプチドのC末端領域における十数個～100個程度の連続したアミノ酸から成るペプチドを挙げることができる。

[0054] 例えば、ポリクローナル抗体の場合には、上記抗原を単独、又は、セルロース、重合アミノ酸、アルブミン及びキーホールリンペットヘモシアニン(KLH)等の適当な担体に結合させて、アジュバントの存在又は非存在下で、例えば、ラット、ウサギ、ヒツジ

、ヤギ、ウマなどの適当な動物に対して免疫誘導することによって容易に得ることができる。ポリクローナル抗体は免疫された動物の血清から公知の様々な方法によって回収及び精製することができる。

[0055] 一方、モノクローナル抗体を製造するためには、例えば、上記の免疫された動物から抗体産生細胞(例えば、脾臓又はリンパ節由来)を回収し、公知の不活化増殖細胞(例えば、マウスミエローマ株P3X63Ag8 株やそれ由来のSp2/OAg-14 等、あるいはラットミエローマ株Y3-Ag1.2.3, YB2/0, IR983F 等の骨髓腫細胞株)との細胞融合により、ハイブリドーマを作成する。これを更にクローニングし、本発明のポリペプチド等に特異的に認識する抗体を生産しているハイブリドーマのクローンを選別し、該ハイブリドーマの培養液からモノクローナル抗体を回収し精製することによって容易に得ることができる。

[0056] 尚、合成ペプチドに対する抗体の作製と抗体の精製に関する参考文献として、例えば、新細胞工学実験プロトコル、東大医科学研究所制癌研究部編、秀潤社、1993年、2-2-2,合成ペプチドに対する抗体の作製、p210-217を挙げるができる。

[0057] 更に、当業者には公知である様々な遺伝子工学的手法により、こうして得られた抗体の抗原決定基等を含む、ヒト化抗体等の各種キメラ抗体も容易に製造することができる。本発明の抗体は、体液や組織などの被検体中に存在する本発明のポリペプチド(蛋白質)等を検出するために使用することができる。また、これらを精製するために使用する抗体カラムの作製、精製時の各分画中の本発明のポリペプチド(蛋白質)の検出、被検細胞内における本発明のポリペプチド(蛋白質)の挙動の分析などのために使用することができる。

[0058] 更に、本発明の抗体は、公知の方法による被検液中の本発明のポリペプチド(蛋白質)等の定量、特に、モノクローナル抗体を使用したサンドイッチ免疫測定法による定量、及び組織染色等による検出などに使用することができる。それによって、例えば、本発明のポリペプチド(蛋白質)等が関与する疾病の診断を行なうことができる。これらの目的には、抗体分子そのものを用いてもよく、また、抗体分子のF(ab')<sub>2</sub>、Fab'、あるいはFab画分を用いてもよい。本発明の抗体を用いる本発明の蛋白質等の定量法は、特に制限されるべきものではなく、被測定液中の抗原量(例えば、蛋白質量

）に対応した抗体、抗原もしくは抗体-抗原複合体の量を化学的または物理的手段により検出し、これを既知量の抗原を含む標準液を用いて作製した標準曲線より算出する測定法であれば、いずれの測定法を用いてもよい。例えば、ネフロメトリー、競合法、イムノメトリック法およびサンドイッチ法が好適に用いられるが、感度、特異性の点で、後述するサンドイッチ法を用いるのが好ましい。標識物質を用いる測定法に用いられる標識剤としては、当該技術分野で公知の、例えば、放射性同位元素、酵素、蛍光物質、発光物質などを用いることができる。

[0059] これらの測定・検出方法に関する一般的な技術手段の詳細については、総説、成書などを参照することができる。例えば、入江寛編「続ラジオイムノアッセイ」(講談社、昭和54年発行)、石川栄治ら編「酵素免疫測定法」(第3版)(医学書院、昭和62年発行)、「Methods in ENZYMOLOGY」Vol. 70(Immunochemical Techniques(Part A))、同書Vol. 73(Immunochemical Techniques(Part B))、同書Vol. 74(Immunochemical Techniques(Part C))、同書Vol. 84(Immunochemical Techniques(Part D:Selected Immunoassays))、同書Vol. 92(Immunochemical Techniques(Part E:Monoclonal Antibodies and General Immunoassay Methods))、同書Vol. 121(Immunochemical Techniques(Part I:Hybridoma Technology and Monoclonal Antibodies))(以上、アカデミックプレス社発行)、また、個体発生の実験法を含め発生工学的実験法は、別冊実験医学・ジーンターゲイングの最新技術(p34-41、2000、羊土社発行)、マウス操作マニュアル第二版(p225-252、p279-285、1994、近代出版発行、増刊実験医学・発生工学実験法(全196頁、1994、羊土社発行などを参照することができる。

[0060] 本発明のポリペプチド(蛋白質)又はその一部分からなるペプチドをコードするDNAに実質的に相補的な塩基配列を有するアンチセンス核酸としては、当該DNAの塩基配列に実質的に相補的な塩基配列を有し、該DNAの発現を抑制し得る作用を有するものであれば、いずれのアンチセンス核酸であってもよい。実質的に相補的な塩基配列とは、例えば、本発明のDNAに相補的な塩基配列の全塩基配列または部分塩基配列と約95%以上、最も好ましくは100%の相同性を有する塩基配列などが挙げられる。又、これらアンチセンス核酸と同様の作用を有する核酸配列(DNA、RNAまたはそれら核酸の修飾体)も本発明でいうアンチセンス核酸に含まれる。また、

当該DNAの塩基配列情報を基に合成した短い2重鎖RNA(RNAi)についても、公知の核酸合成装置などを用いて製造することができる。

[0061] 更に、本発明のポリペプチド(蛋白質)等は、これら物質の活性を阻害する化合物またはその塩のスクリーニングのための試薬として有用である。すなわち、本発明は、本発明のポリペプチド(蛋白質)、その一部からなるペプチドまたはそれらの塩を用いることを特徴とする、該物質又はそれらの塩の活性を阻害する化合物(以下、「阻害剤」ともいう)のスクリーニング方法、及びその為のスクリーニング用キットを提供する。本発明のスクリーニング方法またはスクリーニング用キットを用いて得られる化合物またはその塩は、上記した試験化合物から選ばれた化合物であり、本発明のポリペプチド(蛋白質)等の生物学的活性を阻害する化合物である。該化合物またはその塩は、本発明の蛋白質等の活性を直接阻害するものであってもよいし、本発明のポリペプチド(蛋白質)等の発現を阻害することによって間接的に本発明のポリペプチド(蛋白質)等の活性を阻害するものであってもよい。該化合物の塩としては、例えば、薬学的に許容可能な塩などが用いられる。例えば、無機塩基との塩、有機塩基との塩、無機酸との塩、有機酸との塩、塩基性または酸性アミノ酸との塩などがあげられる。本発明のポリペプチド(蛋白質)等の生物学的活性を阻害する化合物も上記各種疾病に対する治療・予防剤などの医薬として使用できる可能性がある。

[0062] 本発明のDNA及び該DNAを含む齧歯類由来遺伝子をプローブとして使用することにより、マウスはもとより齧歯類、更にヒトにおける本発明のポリペプチド又はその一部分からなるペプチドをコードするDNAまたはmRNAの異常(遺伝子異常)を検出することができるので、例えば、該DNAまたはmRNAの損傷、突然変異あるいは発現低下や、該DNAまたはmRNAの増加あるいは発現過多などの遺伝子診断剤として有用である。本発明のDNAを用いる上記の遺伝子診断は、例えば、公知のノーザンハイブリダイゼーションやPCR-SSCP法(Genomics, 第5巻, 874-879頁(1989年)、Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America, 第86巻, 2766-2770頁(1989年))などにより実施することができる。更に、本発明の相同遺伝子であるヒトKIAA0620遺伝子に異常があったり、欠損している場合あるいは発現量が減少している場合、生体内において正常な機能を発揮でき



ない患者に対しては、公知手段に従って(1)レトロウイルスベクター、アデノウイルスベクター、アデノウイルスアソシエートウイルスベクターなどの適当なベクターをベヒクルとして使用する遺伝子治療によって、本発明のDNA又はヒト由来遺伝子を該患者体内に導入し、発現させるか、又は(2)本発明のポリペプチド(蛋白質)あるいはヒト由来ポリペプチド(蛋白質)又は本発明の抗体を該患者に注入すること等によって、該患者において本発明の蛋白質等の機能を発揮させることができるものと考えられる。前者の場合、本発明のDNA又はヒト由来遺伝子を適当なベクターをベヒクルとして使用し、ベクターにのせた形の該DNAを単独、又は、摂取促進のための補助剤とともに、遺伝子銃やハイドロゲルカテーテルのようなカテーテルによって投与することも可能である。

[0063] 本明細書および図面において、塩基やアミノ酸などを略号で表示する場合、IUPAC-IUBCommission on Biochemical Nomenclatureによる略号あるいは当該分野における慣用略号に基づくものであり、またアミノ酸に関し光学異性体があり得る場合は、特に明示しなければL体を示すものとする。

[0064] 本願明細書の配列表中で、以下の配列番号は以下の配列を示す。

[配列番号:1]本発明のポリペプチドのアミノ酸配列(アミノ酸数:1,746)を示す。

[配列番号:2]配列番号:1で示されるアミノ酸配列を有する本発明のポリペプチドをコードするDNAの塩基配列を含む、クローンmpf00920の全塩基配列(6,178塩基対)を示す。

[配列番号:15]配列番号1に示される本発明のポリペプチドのN末端側に更に251個のアミノ酸(配列番号11)が付加されたアミノ酸配列(アミノ酸数:1,997)を示す。

[配列番号:16]配列番号:配列番号:15で示されるアミノ酸配列を有する本発明のポリペプチドをコードするDNAの塩基配列を含む全塩基配列(6,931塩基対)を示す。

[配列番号:18]マウス由来の本発明ポリペプチド膜外領域のアミノ酸配列(アミノ酸数:1,337)を示す。

[配列番号:19]配列番号:18で示されるアミノ酸配列を有する本発明ポリペプチド膜外領域をコードするDNAの塩基配列を含む全塩基配列(4,011塩基対)を示す。

## 実施例

[0065] 以下に、実施例により本発明をさらに具体的に説明するが、本発明はそれに限定されるものではない。なお、実施例における各種遺伝子操作は、Molecular cloning third.ed. (Cold Spring Harbor Lab.Press, 2001)に記載されている方法に従った。

### [0066] (1) マウス胎児尾芽由来cDNAライブラリーの構築

attB1部位を有するオリゴヌクレオチド:5'  
-FgcGCACCACTTTGTACAAGAAAGCTGGGCGGCCGC(T)<sub>18</sub>-3'(F、gおよびcは、それぞれフルオレッセイン基、フォスフォロチオエイト修飾G、フォスフォロチオエイト修飾C残基を表す)をプライマーとして、マウス胎児尾芽(ICRマウス受精11.5日目)のS1, S0, S-1, 及びS-2に関わる前体節中胚葉及び体節中胚葉)由来mRNAを鋳型にSuperScriptII逆転写酵素キット(インビトロジェン社製)で2本鎖cDNAを合成した。これにattB1部位を有するアダプターをcDNAにライゲーションした。その後、アガロースゲルで1kb-2kb、2kb-3kb、3kb-4kb、4kb-5kb、と5kb-7kbにcDNAをサイズ分画した。これらを、サイズを小さくしたattP pSPORT-1エントリーベクター(インビトロジェン社製)にBP反応により移し換えた後、大腸菌ElectoroMax DH10B株(インビトロジェン社製)にエレクトロポレーション法により導入した。プレートに出現した10<sup>6</sup>個以上の形質転換体を集め、液体培地中で、37℃で2-3時間培養した後プラスミドを調製した。スーパーコイルドプラスミドの形でサイズ分画した後、LR反応によりattR pBCデスティネーションベクター(インビトロジェン社製)にcDNAを移し換えた。このプラスミドを精製後、DH10B株にエレクトロポレーション法により導入し、各分画が期待されるサイズになるまで、上記の分画操作を2-3回繰り返した。最後に各分画ごとにDH10B株にプラスミドを導入した。なお、ここで用いた試験管内での相同組み換え反応を利用したクローニングシステムは小原等の方法 (Nucleic Acids Res., 29, e22 (2001)およびDNA Research Vol.9, 47-57(2002)) に従った。

[0067] 次に、全ての画分に含まれる約16,608個のクローンの3'末端DNA配列を決定した。この中から、ヒトKIAA0620に相同性が高いクローンのcDNAに関して全塩基配列の決定を行なった。配列決定には、アプライドバイオシステム社製のDNAシーケンサー (ABI PRISM3700)と同社製反応キットを使用した。大部分の配列はショットガンクロ

ーンをダイターミネーター法を用いて決定した。一部の塩基配列については、決定した塩基配列を元にしてオリゴヌクレオチドを合成し、プライマーウォーキング法で決定した。

[0068] (2) ホモロジー検索による本発明DNAを含むクローンの決定

次に、こうして得られた全塩基配列に基づき、DNA解析プログラム(Fasta & Blast)を用いたホモロジー検索を実施したところ、公開されているデータベースの中のヒト KIAA0620 遺伝子と高いホモロジーを示す候補クローン mpf00920 が見出された。更に、別のDNA解析プログラム(BESTFIT)を用いて、このクローン mpf00920 とヒト KIAA0620 のアミノ酸配列と塩基配列について比較したところ、アミノ酸配列のレベルでは、ヒト KIAA0620 遺伝子がコードするアミノ酸配列(1,985アミノ酸長)の238番目から1,985番目(1,748アミノ酸長)と配列番号:1で示される mpf00920 のアミノ酸配列(1,746アミノ酸長)の1番目から1,746番目までアミノ酸配列(1,746アミノ酸長)について、約91.88%のホモロジーを示すことが判明した。また、本発明の配列番号:1で示されるアミノ酸配列(1,746アミノ酸長)の974番目から975番目の間に、ヒト KIAA0620 遺伝子がコードするポリペプチドのアミノ酸配列では、2つのアミノ酸、すなわちバリン及びアラニン(V,A)の挿入が認められることが判明した。

[0069] 公開されたポリペプチドのアミノ酸配列に関するデータベースを検索すると、複数の報告があったが、本発明のポリペプチドのアミノ酸配列と同じ配列についての報告はなかった。詳しくには、次に示す公開されたポリペプチドのアミノ酸配列に対し、本発明の mpf00920 ポリペプチドのアミノ酸配列(1,746アミノ酸長)と、比較的高いホモロジーを示す配列が2件認められるが、実質的に同一である配列はない。

[0070] 1) 国際公開番号 WO200114420-A2 (発明の名称: Human Plexin-D1, Applicant: Hyseq INC., Publication date: 11, Oct. 2001) の Human Plexin-D1 (1,925アミノ酸長) の178番目から1,925番目の1,748アミノ酸長のアミノ酸配列と、本発明の mpf00920 蛋白質(1,746アミノ酸長)の1番目から1,746番目の1,746アミノ酸長のアミノ酸配列とで、比較的高いホモロジーが認められた(約91.70%)。WO200114420-A2 の Human Plexin-D1 (1,925アミノ酸長) はヒト由来であり、ポリペプチド断片のアミノ酸配列について診断用蛋白質、治療用あるいはバイオ医薬用として記載されているが、その機

能については不明である。相同する1,925アミノ酸長のアミノ酸配列に対し、本発明のマウス由来の1,746アミノ酸配列は、新規配列でありかつ機能についても記載可能で有用である。

[0071] 2) 国際公開番号WO200157188-A2 (発明の名称: Human plexin-B1/SEP receptor homologue, SEQ ID NO:2079, Applicant: Hyseq INC., Publication date: 09, Aug. 2001)のHuman Plexin-B1/SEP receptor homologue, SEQ ID NO:2079D1 (1,992アミノ酸長)の238番目から1,992番目の1,755アミノ酸長のアミノ酸配列と、本発明のmpf00920蛋白質(1,746アミノ酸長)の1番目から1,746番目の1,746アミノ酸長のアミノ酸配列とで、比較的高いホモロジーが認められた(約91.51%)。WO200157188-A2のHuman Plexin-B1/SEP receptor homologue, SEQ ID NO:2079D1(1,992アミノ酸長)はヒト由来であり、ポリペプチド断片のアミノ酸配列について診断用蛋白質、治療用あるいはバイオ医薬用として記載されているが、その機能については不明である。相同する1,925アミノ酸長のアミノ酸配列に対し、本発明のマウス由来の1,746アミノ酸配列は、新規配列でありかつ機能についても記載可能で有用である。

[0072] 公開された遺伝子の塩基酸配列に関するデータベースを検索すると、本発明のmpf00920塩基配列(6,178塩基長)とホモロジーを有する配列について複数の報告があったが、本発明のmpf00920塩基配列と同じ配列についての報告はなかった。詳しくには、次に示す公開された塩基配列に対し、本発明のmpf00920塩基配列(6,178塩基長)と、やや高いホモロジーを示す配列が4件認められるが、本発明のmpf00920塩基配列(6,178塩基長)と実質的に同一である配列はない。

[0073] 1) 国際公開番号WO200281745-A2 (発明の名称: Coding sequence SEQ ID 118, downregulated in osteogenesis, Applicant: Aventis Pharma SA., Publication date: 17, Oct. 2002)のCoding sequence SEQ ID 118, downregulated in osteogenesis (6,754塩基長)の710番目から5,958番目までの5,249塩基長と本発明の塩基配列(6,178塩基長)の1番目から5,243番目までの5,243塩基長とで、約86.95%という比較的高いホモロジーが認められた。Coding sequence SEQ ID 118は骨形成時に発現抑制が認められるヒト由来の塩基配列であり、本発明のmpf00920塩基配列(配列番号2: 6,178塩基長)に対して比較的高いホモロジーが認められるが、本発明の塩基配列と

は異なる配列である。

[0074] 2) 国際公開番号WO200114420-A2 (発明の名称: Human cDNA encoding Plexin-D1, Applicant: Univ. Torino, Univ. California, Publication date: 01, Mar. 2001) Human cDNA encoding Plexin-D1 (5,892塩基長)の542番目から5,790番目までの5,249塩基長と本発明の塩基配列(6,178塩基長)の1番目から5,243番目までの5,243塩基長とで、約86.91%というやや高いホモロジーが認められた。Human Plexin-D1 (6,178塩基長)はヒト由来であり、それがコードするポリペプチド断片のアミノ酸配列について診断用蛋白質、治療用あるいはバイオ医薬用として記載されているが、その機能については不明である。このやや高いホモロジーが認められる6,178塩基長の塩基配列に対し、本発明のマウス由来の6,178塩基長の塩基配列は、新規配列でありかつ機能についても記載可能で有用である。

[0075] 3) 国際公開番号WO200157188-A2 (発明の名称: Human plexin-B1/SEP receptor-encoding cDNA, SEQ ID NO:729, Applicant: HYSEQ INC., Publication date: 09, Aug., 2001)のHuman Plexin-B1/SEP receptor homologue-encoding cDNA, SEQ ID NO:729(7,080塩基長)の配列番号710番目から5,979番目までの5,270塩基長と本発明の塩基配列(6,178塩基長)の配列番号1番目から5,243番目までの5,243塩基長とで、約85.50%というやや高いホモロジーが認められた。Human Plexin-B1/SEP receptor homologue-encoding cDNA, SEQ ID NO:729(7,080塩基長)はヒト由来であり、それがコードするポリペプチド断片のアミノ酸配列について診断用蛋白質、治療用あるいはバイオ医薬用として記載されているが、その機能については不明である。このやや高いホモロジーが認められる7,080塩基長の塩基配列に対し、本発明のマウス由来の6,178塩基長の塩基配列は、新規配列でありかつ機能についても記載可能で有用である。

[0076] 4) 国際公開番号WO200281745-A2 (発明の名称: Coding sequence SEQ ID 43, downregulated in osteogenesis (Applicant: Aventis Pharma SA., Publication date: 17, Oct., 2002)のCoding sequence SEQ ID 43, downregulated in osteogenesis (1,073塩基長)の96番目から1,063番目までの968塩基長と本発明の塩基配列(6,178塩基長)の4,909番目から5,875番目までの967塩基長とで、約99.90%という高いホモロ

ジーが認められた。Coding sequence SEQ ID 43は骨形成時に発現抑制が認められるヒト由来の塩基配列であり、本発明のmpf00920塩基配列(6,178塩基長)に対して高いホモロジーが認められるが1,073塩基長とかなり短く、本発明の塩基配列の3プライム側非コード領域に本発明の塩基配列の一部と相同性を有するのみの配列といえる。

[0077] 1)、2)及び3)で出願された配列については、本発明の塩基配列(6,178塩基長)と比較すると、上記に示すようにやや高いホモロジーが認められた。しかし、本発明の遺伝子の配列はやや高いホモロジーが認められるものの全く異なる新規な配列と判断される。また、4)で出願された配列については、本発明の塩基配列すなわちmpf00920遺伝子配列(6,178塩基長)の全長をカバーするものでなく、3プライム側非コード領域に本発明の塩基配列の一部と部分的に高いホモロジーが認められる関係にあり、4)の配列と本発明の遺伝子の配列は、一部分に高いホモロジーが認められるものの全く異なる新規な配列と判断される。

[0078] 以上のホモロジー検索の結果から、候補クローンmpf00920はヒトKIAA0620遺伝子と比較的高いホモロジーを示し、既にいくつかの報告がある数個の既知遺伝子に類似であるが、全く新しい齧歯類由来の新規遺伝子であることが判明した。

[0079] (3)モチーフ検索

本発明のDNAに関して、PROSITE databaseを検索するための蛋白質解析プログラムであるpftools (Bairoch A, Bucher P, Hofmann K, Nucleic Acids Res. 1997 Jan 1;25(1):217-21)、及びPfam databaseを検索するための蛋白質解析プログラムhmmer 2.1(Sonnhammer, E. L. L., Eddy, S. R., Birney, E., Bateman, A., and Durbin, R., Nucleic Acids Res 1998; 26, 320-322)を用いてモチーフ検索を行なった(Suyama et. al. 1999 Nucleic Acids Res. 27: 338-339)。

[0080] 詳しくは、HMMSmart検索法(Schultz, J. et. al., 1998, Proc Natl Acad Sci USA, 95: 5857-5864)によると、配列番号:1に示されるアミノ酸配列のうちN-末端側から3-352番目にSemaphorin/CD100 antigenドメインが見出された。次に、HMMSmart検索法によると、あるいはHMMPfam検索法によっても同じく配列番号:1に示されるアミノ酸配列のうちN-末端側から371-424番目にPlexin/Semaphorin/integrinドメインが見出され

た。更に、HMMPfam検索法によると、524-576番目及び671-712番目に Plexin/Semaphorin/integrinドメインを検出することができた。また、HMMSmart検索法によるとN-末端側から713-802番目に、HMMPfam検索法によるとN-末端側から 714-802番目にCell surface receptor IPT/TIGドメインを、また、HMMSmart検索法によるとN-末端側から803-889番目に、HMMPfam検索法によるとN-末端側から 804-889番目にCell surface receptor IPT/TIGドメインを、更に、HMMSmart検索法によるとN-末端側から891-970番目に、HMMPfam検索法によるとN-末端側から 892-978番目にCell surface receptor IPT/TIGドメインが見出された。更に、SOSUIという汎用transmembrane(TM)segment検索用プログラムにより検索すると、N-末端側から1,090-1,112番目にETAIVVSIVICSVLLLLSVVALFで示される膜貫通(TM)セグメントが見出された。

[0081] Semaphorin/CD100 antigenドメインは、Plexinファミリーの細胞膜外に認められるその配列の保存性が高い特徴的なドメインで、Semaphorinとの特異的結合に関係すると考えられている(文献9,16)。Plexin/Semaphorin/integrinドメインは、Plexin, Semaphorin 及びIntegrinにみられる特徴的な配列からなる特定のドメインをいう。細胞外に出ているいくつかの受容体に認められるシステインに富むこの繰り返し構造の機能について詳細は不明であるが、同種親和性を經由する細胞接着を仲介する新規な神経細胞表面分子として知られている。Plexinは脳や上皮の組織中に存在し Semaphorinが誘導する脳成長錐体(growth cone)の崩壊や喪失に、また、Integrinは上皮細胞の移動機能を完結するのに関わっている(文献9,16)。IPT/TIGドメインはイムノグロブリン様の折りたたみ構造を有し、同ドメインはDNA結合に関連する細胞内転写因子と同じくMet、Ronといった細胞膜表面受容体にも認められる。Ron チロシンキナーゼ受容体はMetやSeaといったサブファミリーのメンバーと特徴的な機能を共有する。例えば、その機能は細胞の分離や解離、細胞の運動、細胞外骨格の細胞内陥没(invasion)といった現象を制御する機能である(文献9,16)。

[0082] これらにより、本発明のmp00920遺伝子がコードするポリペプチドのアミノ酸配列は、1,746アミノ酸長とヒトKIAA0620と比較し237アミノ酸短く、Semaphorin/CD100 antigenドメイン、3つのPlexin/Semaphorin/integrinドメイン、及び3つのCell surface

receptor IPT/TIGを有し、かつC-末端側に膜貫通(TM)セグメントが存在する、ヒト KIAA0620蛋白質(1,985アミノ酸)より239アミノ酸長短い構成(図1)であることを見出し、機能を推定することが可能となった。

- [0083] (4-1) マウス胎仔を用いた発生過程におけるmpf00920遺伝子の発現部位検索  
ヒトKIAA0620遺伝子は、Plexinファミリー(Tamagnone, L., et al., 2001, Cell, 99:71-80)であること、ヒトKIAA0620遺伝子をプローブとしてマウス発生過程において mRNAを検索した結果、血管内皮細胞あるいは中枢神経系(CNS)でヒトKIAA0620遺伝子とハイブリダイズするmRNAが発現していること等の報告があるが(van der Zwaag, B. et al., Dev. Dyn., 2002, 225:336-343)、本発明の新規Plexin遺伝子のマウス発生過程における、発現部位は不明であった。本発明の遺伝子うちの一つであるマウスmpf00920遺伝子の発生過程における発現部位を検索することを目的として以下の実験を行った。
- [0084] マウスmpf00920遺伝子をPCR法で増幅してProbeを作成するために必要なフォワードプライマーとリバースプライマーを市販のDNA自動合成機を用いて合成した。フォワードプライマーの配列を5'-CCCCGGAAGTTGAACGTGTC-3' (配列番号:3)、リバースプライマーの配列を5'-CCACCTGTTCAAAGTTGTGCTG-3' (配列番号:4)とし、それらのプライマーを用いてマウスmpf00920遺伝子の転写産物をPCR法で増幅すると、アンチセンスあるいはセンスプローブとして働く各々約1,069塩基長(bp)のDNA断片が得られる設計にした。目的とするPCR産物、すなわちアンチセンスあるいはセンスプローブ用の約1,069(bp) DNA断片をPromega社が供給するT-vectorにクローン化した。T-vectorにクローン化した1,069(bp) DNA断片を鋳型とし、T7またはSP6RNAポリメラーゼを用いてPromega社が示す方法によりマウスmpf00920遺伝子発現産物を検出可能とするアンチセンスcRNA プローブ及び陰性コントロール用として使用するセンスcRNA プローブを作製し、同遺伝子の各個体発生段階に対応した組織特異的発現解析を目的とする以下の実験に供した。
- [0085] すなわち、受精後の経過日数に従ってホールマウントin situハイブリダイゼーションに通常用いられるin situハイブリダイゼーション用固定法により固定されたさまざまな時期の個体発生段階を反映するマウス胎仔(d.p.c.:発生段階を交尾後の日数にて



表示する)を被検体として用い、SuperBioChips Lab 社が供給するDIGラベル法により同社が示すホールマウントin situハイブリダイゼーションの方法に用いてマウス胎仔ホールマウント組織特異的発現の解析を行った(参照:細胞工学別冊 脱アイソトープ実戦プロトコール、192-223、1998)。

- [0086] マウス胎仔を用いた本遺伝子発現部位の解析結果により以下の点について新発見を見出した。すなわち、マウスmpf00920遺伝子は個体発生時の血管形成時期(Vasculogenesis)にのみ血管内皮細胞特異的に発現すること、とりわけ、個体発生時における血管前駆細胞(Flk1陽性細胞)が出現する時期(7.5 ~8.0 d.p.c)と一致して、血管部位のmpf00920陽性シグナル認められ、血管形成時期を通して血管特異的な発現パターンを示した。顕微鏡下におけるmpf00920遺伝子の個体発生時における発現部位の詳細な解析から、mpf00920遺伝子の発現は単に血管内皮細胞特異的発現として認められるのではなく、マウス胎仔発生過程における初期血管形成時期(10.5, 8.0,; 及び9.5 d.p.c)に血管内皮細胞特異的な発現パターンを示すことが認められた(図2A, 図2B, 図2C、図2D)。一方、個体発生後期から成体にかけての時期では、血管内皮細胞特異的な発現は認められなかった。

- [0087] 尚、図2Aの上の図は陰性コントロールとして用いたセンスcRNA断片で非特異的遺伝子発現の検出を、図2Aの下図はアンチセンスcRNA断片で検出したmpf00920遺伝子の発現パターンの検出を試みた結果を示す。これらの結果により、アンチセンスcRNA断片でmpf00920遺伝子発現が検出されるが、センスcRNA断片で検出されず、用いた約1,069塩基長(bp)のDNA断片が非特異的遺伝子発現のシグナルをひろう可能性が低いことが示された。

- [0088] (4-2)受精後14.5日目胎仔及び成体におけるmpf00920遺伝子のin situ ハイブリダイゼーション法によるmRNAレベルでの発現頻度の検索

ヒトにおけるmRNAレベルでのヒトKIAA0620遺伝子の発現頻度についての知見はないが(<http://www.kazusa.or.jp/huge/gfpage/KIAA0620/>、DNA Res., 1998, 5:169-176earch, 1997, 4:345-349)、ヒトKIAA0620遺伝子と相同性を示すマウスmpf00920遺伝子のマウスにおけるmRNAレベルでの発現頻度について、in situ ハイブリダイゼーション法により成長後の成体マウスを用いて組織特異的発現を解析する

ことにより検索した。マウスmpf00920遺伝子をPCR法で増幅してProbeを作成するために必要なフォアワードプライマーとリバースプライマーを市販のDNA自動合成機を用いて合成した。フォアワードプライマーの配列を5'-

CCCCGGAAGTTGAACGTGTC-3' (配列番号:3)、リバースプライマーの配列を5'-CCACCTGTTCAAAGTTGTGCTG-3' (配列番号:4)とし、それらのプライマーを用いてマウスmpf00920遺伝子の転写産物をPCR法で増幅すると、アンチセンスあるいはセンスプローブとして働く各々約1,069塩基長(bp)のDNA断片が得られる設計にした。目的とするPCR産物、すなわちアンチセンスあるいはセンスプローブ用の約1,069(bp) DNA断片をPromega社が供給するT-vectorにクローン化した。T-vectorにクローン化した1,069(bp) DNA断片を鋳型とし、T7またはSP6RNAポリメラーゼを用いてPromega社が示す方法によりマウスmpf00920遺伝子発現産物を検出可能とするアンチセンスcRNA プローブ及び陰性コントロール用として使用するセンスcRNA プローブを作製し、同遺伝子の組織特異的な発現解析を目的とする以下の実験に供した。

[0089] すなわち、マウス受精後14.5日目胎仔の矢状方向(sagittal)凍結切片を被検体として用い、Proteinase K で37℃、15 分間処理を含む固定を行った後、SuperBioChips Lab 社が供給するDIGラベル法により同社が示すin situハイブリダイゼーションの方法に従って、一つのスライドガラス上の組織片に対し500ng DIGラベルRNAをプローブとして使用し、50℃で16時間のハイブリダイゼーションを行い、組織特異的な発現解析を行った(参照:細胞工学別冊 脱アイソトープ実戦プロトコル、192-223、1998)。

[0090] 表1に示したように、得られた各組織切片におけるマウスmpf00920遺伝子の発現シグナルの強度解析結果によると、発現強度は脳・大脳皮質、顎下腺に於いて強い発現が、三叉神経の神経節、骨・肋骨、広背筋、胃、腸に於いてやや強い発現が、また、皮膚・真皮、脳・小脳、骨・背骨、心臓・心房の血管、心臓・心室の心筋層、心臓・心室の血管といった各種臓器に於いて発現が認められた。皮膚の表皮、肺の血管、肺・肺胞細胞、心臓・心房の心筋層についてはシグナルが弱くて確認できなかった。図3A及び図3B参照。

[0091] 以上の結果から、本発明の遺伝子がコードするポリペプチドは、マウス受精後14.5

日目胎仔において脳・大脳皮質、顎下腺に於いて強い発現が、三叉神経の神経節、骨・肋骨、広背筋、胃、腸に於いてやや強い発現が認められ、脳・神経、顎下腺、皮膚、骨、筋肉、心臓をはじめ各種臓器に広範に認められ、これにより関連する臓器、組織の発生・分化や機能保全に関わっているといえる。

[0092] 表1) マウス受精後14.5日目胎仔の矢状方向(sagittal)凍結切片を用いたin situハイブリダイゼーションの結果 (+++:強い発現、++:やや強い発現、+:発現が認められる、-:シグナルが弱くて確認できない)

[0093] [表1]

器官/組織・大分類	器官/組織・小分類	ハイブリダイゼーション強度
Skin(皮膚)	Epidermis(表皮)	-
	Dermis(真皮)	+
Brain(脳)	Cerebral cortex(大脳皮質)	+++
	Cerebellum(小脳)	+
Trigeminal ganglion(三叉神経の神経節)		++
Submandibular gland(顎下腺)		+++
Bone(骨)	Spine(背骨)	+
	Costea(肋骨)	++
Lung(肺)	Blood vessel(血管)	-
	Alveolar cells(肺胞細胞)	-
Heart(心臓)	Atrium(心房)-myocardium(心筋層)	-
	Atrium(心房)- blood vessel(血管)	+
	Ventricle(心室)- myocardium(心筋層)	+
	Ventricle(心室)- blood vessel(血管)	+
Latissimus dorsi muscle(広背筋)		++
Stomach(胃)		++
Intestine(腸)		++

[0094] 更に、マウス成体の各組織について作製されたパラフィン組織切片を載せたTissue Array Slide (SuperBioChips Lab社製:フナコシ株式会社が供給するLot:ZE1)を被検体として用い、Proteinase K で37℃、15 分間処理を含む固定を行った後、SuperBioChips Lab 社が供給するDIGラベル法により同社が示すin situハイブリダイ

ゼーションの方法に従って、一つのスライドガラス上の組織片に対し500ng DIGラベルRNAをプローブとして使用し、50℃で16時間のハイブリダイゼーションを行い、組織特異的な発現解析を行った(参照:細胞工学別冊 脱アイソトープ実戦プロトコール、192-223、1998)。

- [0095] 表2に示したように、得られた各組織切片におけるマウスmpf00920遺伝子の発現シグナルの強度解析結果によると、同遺伝子の成長後の成体において発現強度は胃の重層扁平上皮に於いて強い発現、子宮の子宮腺上皮細胞、脳のプルキンエ細胞層に於いてやや強い発現が、また、皮膚、脾臓、心臓、舌、腎臓、精巣、大脳の神経膠細胞といった各種臓器に於いて発現が認められた。皮膚の真皮、脾臓の赤脾髄、骨格筋、肺、肺の血管、心臓の血管、唾液腺、肝臓、膵臓、小腸、大腸、卵巣、胸腺、についてはシグナルが弱くて確認できなかった。図4A、図4B、図4C参照。
- [0096] 以上の結果から、本発明の遺伝子がコードするポリペプチドは、成体において胃、子宮、脳をはじめ各種臓器に広範に認められ、これにより関連する臓器、組織の発生・分化や機能保全に関わっているといえる。特に、本発明のポリペプチドが、脳・神経系における神経細胞の伸張やネットワーク維持、心臓・血管や腎臓等管腔構造を有する臓器での構造維持に関わると推定される。また、本発明のポリペプチドが、発生初期において血管新生に関わっている場合の機能と、成体における脳をはじめとする各種組織での例えば神経細胞のガイダンスに関わっている機能とで、分子の働きが異なる可能性もある。例えば、神経細胞においてPlexinはNeuropilinと共同して、ダイマー化したSemaphorinと結合して複合体を形成し、神経細胞の伸張を追い払う調節がなされるという(文献16)。
- [0097] 表2) マウス成体パラフィン組織切片を用いたin situハイブリダイゼーションの結果(+++:強い発現、++:やや強い発現、+:発現が認められる、-:シグナルが弱くて確認できない)
- [0098] [表2]

器官/組織・大分類	器官/組織・小分類	ハイブリダイゼーション強度
Skin(皮膚)	Epidermis(表皮)	+
Ear lobe(耳たぶ)	Dermis(真皮)	-
Spleen(脾臓)	White pulp(白脾髄)	+
	Red pulp(赤脾髄)	-
Skeletal muscle(骨格筋), Abdominal wall(腹壁)		-
Lung(肺)	Blood vessel(血管)	-
	Alveolar cells(肺胞細胞)	-
Heart(心臓)	Myocardium(心筋層)	+
	Blood vessel(血管)	-
Tongue(舌)	Muscle layer(筋層)	+
	Filiform papillae(糸状乳頭)	+
	Stratified squamous epithelium(重層扁平上皮)	+
Salivary gland(唾液腺)		+
Liver(肝臓)		-
Pancreas(膵臓)		-
Stomach(胃)	Stratified squamous epithelium(重層扁平上皮)	+++
	fundic gland(胃底腺)	+
Small intestine(小腸)		-
Colon(結腸、大腸)		-
Kidney, cortex(腎皮質)	Proximal tubule(尿細管)	+
	Tubule(遠位尿細管)	+
Kidney, medulla(腎髄質)	Tubule(管)	+
Urinary bladder(膀胱)		+
Seminal vesicle(精嚢)		+
Testis(精巣)	Sertoli's cells(セルトリ細胞)	+
	Spermatocytes(精母細胞)	+
Epididymis(精巣上体)		-
Uterus(子宮)	Glandular epithelium(子宮腺上皮細胞)	++
Ovary(卵巣)		-
Thymus(胸腺)		-
Cerebrum(大脳)	neuroglia cells(神経膠細胞)	+
Pons(橋)		+
Cerebellum(小脳)	Granular layer(顆粒層)	+
	Purkinje cell layer(プルキンエ細胞層)	++

[0099] (4-3) マウス胎仔発生過程に於けるmKIAA0620のmRNAレベルでの発現頻度

RT-PCR法によりマウスにおけるマウス胎仔発生過程に於けるmKIAA0620のmRNAレベルでの発生段階特異的発現を解析した。フォアワードプライマーの配列を5'-CCCCGGAAGTTGAACGTGTC-3' (配列番号:3)、リバースプライマーの配列を5'-CCACCTGTTCAAAGTTGTGCTG-3' (配列番号:4)とし、それらのプライマーを用いてマウスmpf00920遺伝子の転写産物をPCR法で増幅すると、アンチセンスあるいはセンスプローブとして働く各々約1,069塩基長(bp)のDNA断片が得られる設計にした。目的とするPCR産物、すなわちアンチセンスあるいはセンスプローブ用の約1,069(bp) DNA断片をPromega社が供給するT-vectorにクローン化した。T-vectorにクローン化した1,069(bp) DNA断片を鋳型とし、T7またはSP6RNAポリメラーゼを用いてPromega社が示す方法によりマウスmpf00920遺伝子発現産物を検出可能とするアンチセンスcRNA プローブ及び陰性コントロール用として使用するセンスcRNA プローブを作製し、同遺伝子のマウス胎仔発生過程に対応した発現強度解析を目的とする以下の実験に供した。すなわち、各マウス胎仔発生過程における1stストランドcDNAと上記プライマーをそれぞれ混合し、各々についてPCRを行い、マウスKIAA0620遺伝子の転写産物のうち約1,069(bp)DNA断片の増幅を図った。PCRは、TaqポリメラーゼとしてTaKaRa Ex Taq (宝酒造, #RP001A)を用い、上述のDNA混合液を95° C (2.5分)で加熱した後、95° C (30秒)/60° C (30秒)/72° C (30秒)のサイクルを35回繰り返して行った。コントロールとしてFlk1遺伝子発現を検出するプライマーを使用したFLk1転写産物由来約1129bpDNA断片の増幅も同様にして行った。増幅を終えたPCR産物を、サイズマーカーとともに2% agarose gel(Rockland社製、#50070)を用いて電気泳動で分画し、分画したPCR産物の量を半定量的に比較した(図5)。その結果、Flk1はマウス胎仔発生過程に於ける血管形成が開始された7.5 d.p.c.で発現が認められ、血管形成時期を通じて9.5 d.p.c.に至るまで高発現が継続したのに対し、マウスKIAA0620遺伝子発現は、血管形成が観察されるようになる時期より少し早い6.5 d.p.c.で検出され、血管形成時期を通じて9.5 d.p.c.に至るまで高発現が継続した。このことにより、従来から血管形成のマーカー遺伝子としていわれてきたFlk1に対し、更に早い時期にKIAA0620は発現し血管形成を誘導していると推

察することが出来た。

[0100] (5-1) 5'端DNA配列伸張

マウスmKIAA0620(遺伝子名:mpf00920)の5'端はヒトKIAA0620に比較して短く、mKIAA0620塩基配列に対し付加する配列があるのではないかと推測された。しかし、上記(2)においてヒトKIAA0620遺伝子との比較から推測された5'端配列をマウスcDNAライブラリーから取得することは困難を極めた。そこで、長鎖cDNAといった対象テキスト配列が長い材料を哺乳動物のゲノム配列を高速検索することを可能にするために、特開2003-216615号公報に基づくメモリに比較回路を付加したcontent addressable memory (CAM) を用いた配列の長さに計算時間が依存しない並列比較可能な計算機(ハードウェア)開発とその制御アルゴリズム設計を鋭意研究することにより、超並列ゲノムコンパレーターといった改良された新規システムを構築して、長鎖cDNAを対象とした解析方法を完成した。完成した超並列ゲノムコンパレーターを使用し、公開済みのマウスゲノム配列からマウスmKIAA0620に対する大規模・高速塩基配列検索を実施し、公開済みのマウスゲノム配列のなかからmKIAA0620塩基配列に対し付加する配列に関わる情報(配列番号17)を検索し、その結果、以下に具体的に示すように、本発明の配列番号1に示したアミノ酸配列のN末側に付加される251アミノ酸長のアミノ酸配列を取得するために必要なプライマー配列を設計可能にするに至った。

[0101] (5-2) 5'端DNA配列伸張

配列2に示すmpf00920遺伝子配列の部分配列情報を基にReverse primer(AATCTTGATGTGGTACTCATGGCTCTC, 27塩基長, 名称GSP1, 配列2の3,090番目から3,116番目の27塩基長配列に対する相補的配列:配列番号5)のデザインを行い、マウス胎仔(胎生10.5日齢)から分離・精製したTotal RNAを材料にThermoScript RNaseH<sup>-</sup> RT(Invitrogen)によるインビトロ逆転写反応(50℃ 60分間)を行い、1st strandcDNA(未確認配列を含む)を合成した。次に上記コンパレータによる予想配列情報(ゲノム配列より予想)からForward primer(AAGCTGCTGGGGCGGGGAGATGGGCT, 26塩基長, 配列17の72番目から97番目の26塩基長配列:配列番号6)を、又、配列2に示すmpf00920遺伝子配列の部分

配列情報を基にしてとGSP1より少し内側にReverse

primer(AATGTTGTGTCCTTTGACCCTTAC, 24塩基長, 名称GSP2, 配列2の1,524番目から1,547番目の24塩基長配列に対する相補的配列:配列番号7)をデザインし、PCR反応を用いて、予測配列断片の増幅を行った。しかし、この領域のPCRは、通常の反応条件では増幅反応が起こらず、PCR産物を得ることができなかった。増幅が期待される領域内に反応を阻害する特殊な配列(GCに富む配列)が存在することが推察された。

そこで、GCに富む配列を含む特殊なDNA断片の増幅を可能とすることを目的とし、上記Forward primerとReverse primer (GSP2)を使用して、Platinum Pfx DNA Polymerase (Invitrogen:Cat No.11708-013)と添付のPCRx Enhancer solutionを用い、条件(1× PCRx Enhancer solution 条件:Denature : 94℃ for15s Anneal : 50℃ for 30s Extend : 68℃ for 3min30s, 40cycles)を新たに設定して伸張反応を行った。その結果、目的とする断片約2,300塩基長を含む約2,314塩基長のDNA断片をPCR反応により増幅することが出来た。

- [0102] 得られたDNA断片をプライマリーな鋳型として、上記同様Platinum Pfx DNA Polymerase を用いてNested PCRを行った。すなわち、Forward primer (TTGTCGACACAAGTTTGTACAAAAAAGCAGGCTCT atg ggc tgt ggg cgt ggt ctc cac gga gcc gcc ccc ggg ctg agc, 80塩基長, 配列17の91番目から135番目の45塩基長配列を含む80塩基長:配列番号8)を、又、配列2に示すmpf00920遺伝子配列の部分配列情報を基にしてとGSP2より少し内側にReverse primer (AAATGTGGCTGGCTGGAGTTGGT, 23塩基長, 配列2の1,215番目から1,237番目の23塩基長配列に対する相補的配列:配列番号9)をデザインし、GCに富む配列を含む特殊なDNA断片の増幅を可能とすることを目的とした上記で述べたPCR 条件を参考としてNested PCRを行った。PCR反応条件の詳細は、final : 1× PCRx Enhancer solution, Denature : 94℃ for15s Anneal : 50℃ for 30s Extend : 68℃ for 3min, 35cyclesであった。その結果、目的とする断片約2,020塩基長のDNA断片をPCR反応により増幅することが出来た。

- [0103] 得られたPCR産物をpCR4Blunt TOPO vector (Invitrogen: Cat.No. K4575-J10)へ挿



入し、大腸菌 (DH5  $\alpha$  株) の形質転換を行い、目的とするPCR産物を含むプラスミドDNAを取得した。取得した形質転換株を用いて得られたプラスミドDNAの増幅を行い、増幅したプラスミドDNAを用いてシーケンサーによる目的とするPCR産物の塩基配列の決定を行った。その結果、753塩基長の新規な塩基配列 (配列番号10) 及びそれにコードされるアミノ酸配列 (配列番号11) を新規配列として取得することが出来た。配列番号10を用いた解析結果から、配列番号11がコードする2番目のMetがN'端であると推定された。これはヒトKIAA0620遺伝子がコードするポリペプチドのアミノ酸配列で推定されるN'末端のMetの位置、あるいはvan der Zwaag等 (Dev. Dyn., 2002, 225:336-343, :非特許文献8) の報告にあるヒトPLEXIN-D1のアミノ酸配列のN'末端のMetの位置に比較して71アミノ酸長だけ長い。そこで、本発明の発現実験に於いては、配列番号11の2番目のMetを含むDNA断片を使用した。しかし、同van der Zwaag等の報告にあるヒトPLEXIN-D1のアミノ酸配列で示されるN'から30番目から46番目のシグナル配列 (cleavable signal sequence) に相当する配列が、配列11の102番目から120番目に認められることから、機能的には配列番号11のマウス配列に於いても73番目のMetから蛋白合成が始まってもおかしくはない。すなわち配列11の2番目と73番目のMetは共に蛋白合成開始点である可能性が考えられた。

[0104] (5-3) ホモロジー検索

こうして得られた、mpf00920塩基配列に対し5'に付加した251アミノ酸長及び753塩基長の配列についてホモロジー検索を、FASTA等により検索を実施した結果、比較的高いホモロジーを示す配列が2件認められたが、実質的に同一である配列はない。

[0105] 即ち、国際公開番号WO200114420-A2 (発明の名称: Human Plexin-D1, Applicant: Hyseq INC., Publication date: 11, Oct. 2001) のHuman Plexin-D1 (1,925アミノ酸長) の1番目から177番目の177アミノ酸長のアミノ酸配列と、本発明の mpf00920アミノ酸配列に対し5'に付加した251アミノ酸長の配列 (配列15で示すアミノ酸配列における1番目から251番目のアミノ酸配列) の73番目から251番目の179アミノ酸長のアミノ酸配列とで、やや高いホモロジーが認められる (約86.03%)。

[0106] 更に、国際公開番号WO200157188-A2 (発明の名称: Human plexin-B1/SEP receptor homologue, SEQ ID NO:2079, Applicant: Hyseq INC., Publication date:

09, Aug. 2001)のHuman Plexin-B1/SEP receptor homologue, SEQ ID NO:2079D1 (1,992アミノ酸長)の1番目から237番目の237アミノ酸長のアミノ酸配列と、本発明の mpf00920アミノ酸配列に対し5'に付加した251アミノ酸長の配列(配列15で示すアミノ酸配列における1番目から251番目のアミノ酸配列)の13番目から251番目の237アミノ酸長のアミノ酸配列とで、やや高いホモロジーが認められた(約80.75%)。

- [0107] 以下に示すように、mpf00920塩基配列に対し5'に付加した753塩基長の配列(配列16で示す塩基配列における1番目から753番目の塩基配列)とホモロジーを有する部分配列をクレームする出願は下記のように2件あるが本発明で追加した753塩基長実質的に同一である配列の出願はない。
- [0108] 国際公開番号WO200281745-A2(発明の名称: Coding sequence SEQ ID 118, downregulated in osteogenesis, Applicant: Aventis Pharma SA., Publication date: 17, Oct. 2002)のCoding sequence SEQ ID 118, downregulated in osteogenesis(6,754塩基長)の284番目から709番目までの426塩基長あるいは25番目から230番目までの206塩基長と、本発明の5'に付加した753塩基長の配列(配列16で示す塩基配列における1番目から753番目の塩基配列)のうち328番目から753番目までの426塩基長あるいは64番目から268番目までの205塩基長とで、約89.28%あるいは95.15%という比較的高いホモロジーが認められた。
- [0109] 国際公開番号WO200157188-A2(発明の名称: Human plexin-B1/SEP receptor-encoding cDNA, SEQ ID NO:729, Applicant: HYSEQ INC., Publication date: 09, Aug., 2001)のHuman Plexin-B1/SEP receptor homologue-encoding cDNA, SEQ ID NO:729(7,080塩基長)の配列番号284番目から709番目までの426塩基長あるいは配列番号25番目から230番目までの206塩基長と、本発明の5'に付加した753塩基長の塩基配列(配列16で示す塩基配列における1番目から753番目の塩基配列)のうち配列番号328番目から753番目までの426塩基長あるいは配列番号64番目から268番目までの205塩基長とで、約89.28%あるいは95.15%という比較的高いホモロジーが認められた。
- [0110] 以上のホモロジー検索の結果から、既に記載したmpf00920遺伝子(配列2で示す塩基配列)の5'に753塩基長の塩基配列が付加された塩基配列(配列16で示す塩基配

列)は、各々ヒトKIAA0620遺伝子と比較的高いホモロジーを示し、既にいくつかの報告がある数個の既知遺伝子に類似であるが、全く新しい齧歯類由来の新規遺伝子であることが判明した。

[0111] (6) 遺伝子導入細胞作製

配列2で示すmpf00921遺伝子配列(5'端配列を欠く非全長cDNA:6,178塩基長)と上記(5)で取得した5'端DNA断片(配列番号10)を含むPCR産物を用いて以下の手順で、ORF該当部位の全長cDNA(配列16)を取得した。最初に配列2で示すmpf00921遺伝子配列(マウスKIAA0620の非全長cDNA)をpBluescript SK(+)のマルチクローニングサイトに挿入して組換えプラスミドを作製した。すなわち、pBluescript SK(+)のマルチクローニングサイトの配列内Bam HIサイトを利用し、同一制限酵素で切断処理した5'端DNA断片をフレームが合うようにデザインしLigationし、大腸菌(DH5  $\alpha$  株)の形質転換を行い、目的とする完全長DNA断片を含むプラスミドDNAを取得した。完全長ORFcDNA(5,992塩基長:1,996アミノ酸長のポリペプチドに終始コドンが付加した配列を含めた長さ)を含む上記プラスミドを大腸菌へ形質転換後、精製・回収した。このプラスミドを鋳型に複数の発現コンストラクトを作製した。発現コンストラクト作製には、Gatewayクローニングテクノロジー(Invitrogen: Cat.No. 11821-014)システムを利用し、以下の目的PCR産物をpENTR/D-TOPO Vector (Invitrogen: )へ組み込んだエントリークローンを作製した。ネイティブ蛋白質用として用いるPCR産物は、完全長cDNA(開始コドンから終始コドンまで)として次のプライマーを設計し合成して使用しPCR反応により作製した。すなわち、Forward primerとして CACCatgggctgtgggcgtgtct (24塩基長、配列16の6番目から25番目の20塩基長配列を含む24塩基長配列:配列番号12)を、Reverse primerはReverse primer1 (TCAGGCCTCGCTGTAACACTCATAGA, 26塩基長、配列2の5,218番目から5,243番目の26塩基長配列に対する相補的配列,終始コドンを含む:配列番号13)を用いてエントリークローンを作製した。また、タグ付き融合蛋白型用として用いるタグ付きPCR産物は、タグ付き完全長cDNA(開始コドンから終始コドンまで)として次のプライマーを設計し合成して使用しPCR反応により作製した。すなわち、Forward primerは上述のForward primer(CACCatgggctgtgggcgtgtct, 24塩基長、配列16の6番目から

25番目の20塩基長配列を含む24塩基長配列:配列番号12)をReverse primerはReverse primer2 (GGCCTCGCTGTAACACTCATAGA, 23塩基長, 配列2の5,218番目から5,240番目の23塩基長配列に対する相補的配列,終始コドンを含まない:配列番号14)を用いてエントリークローンを作製した。

- [0112] 各エントリークローンをLR Clonase酵素ミックス(Invitrogen:Cat.No.11791-019)を用いた部位特異的組換え反応により発現用デスチネーションベクター( pcDNA-DEST40 vector、pcDNA-DEST47 vector:どちらもCAGプロモーター制御下にて発現するプラスミドベクター)へ組換えて発現ベクターの構築を行い、マウス KIAA0620ネイティブ蛋白質、マウスKIAA0620-GFP-HisTag、マウスKIAA0620-V5融合蛋白質型の哺乳類細胞での強制発現ベクターを構築した。これらを Transfection 試薬 (Fugene6;Roche社またはTransIT-LT1試薬;Mirus社)を用いてヒト胎児由来腎細胞(HEK293T細胞)に遺伝子導入し、遺伝子導入細胞を作製した。

- [0113] (7-1)合成ペプチドを抗原としたウサギポリクローナル抗体の作製

マウスKIAA0620遺伝子がコードするポリペプチドの一部からなるアミノ酸配列をもとに、ペプチド合成して作製した合成ペプチドを免疫原(抗原)として、常法に従い、ウサギポリクローナル抗体を作製した。抗原としてはmpf00920ポリペプチド配列のうちC-末端から約169アミノ酸離れたところにある15アミノ酸長配列(配列: FLEEQAEEKRGISDPD)に対し末端にシステインを付加した合成ペプチド(配列: CFLEEQAEEKRGISDPD)を、そのN-末で担体とするキーホールリンペットヘモシアニン(KLH)にキャリアーカップリングさせ、担体と結合した合成ペプチドを80%から90%の純度にまで精製したものを抗原として用いた。日本白色種家兔(メス)に初回は抗原量0.15mgにて皮内免疫を、その後は約2週間ごとに抗原量0.3mgにて4回の感作を実施して合計5回の皮内免疫を行った。3回目、4回目の各皮内免疫の後の約5週間目、約7週間目に各々5mlの試験採血を行い、HRPO(ホースラディッシュペーパーオキシダーゼ)結合ヤギIgG抗ウサギ抗体(CAPPEL社製)を用いたELISA法にて抗原に対する抗体値を測定した。全部で2回の試験採血において、夫々、1,000倍希釈、2,000倍希釈、4,000倍希釈、8,000倍希釈、16,000倍希釈にて吸光度(490nm)が3となり、試験採血において抗体価の十分な上昇を確認された。この2回目の試験採血の後、

約8週目に5回の感作を実施し、その後、約9週間目に抗体精製用の全採血を行った。採血した血液から血清を遠心にて分離し抗血清を得た。その抗血清を、ウサギポリクローナル抗体(anti-mKIAA0620 ab)として用いた。

[0114] また、コントロール血清を確保する目的で免疫前に試採血(3ml)を前もって実施した。免疫前のコントロール血清において、1,000倍希釈、2,000倍希釈、4,000倍希釈、8,000倍希釈、16,000倍希釈にて吸光度(490nm)が各々0.171、0.101、0.089、0.084、0.076となり、抗原として用いたアミノ酸配列は免疫前ウサギ血清と反応せず特異性があることが確認された。

[0115] (7-2) 精製ウサギポリクローナル抗体を用いたウエスタンブロット法による各種遺伝子導入細胞でのマウスKIAA0620蛋白質の検出

上記で得られた精製ウサギポリクローナル抗体を用い、ウエスタンブロット法にて各種遺伝子導入細胞でのマウスKIAA0620蛋白質の検出を試みた。遺伝子導入細胞からの蛋白質回収操作については、マウスKIAA0620遺伝子強制発現ベクター導入HEK293T細胞を培養ディッシュ上でPBS(-)溶液で洗浄し、Lysis Buffer(TNE buffer)を用いピペッティング操作を繰り返して可溶化させ、可溶化した溶液を28Gの注射針を通し、次に、遠心操作(700g, 10 min)後、上清をサンプル液として回収した。サンプル液にはマウスKIAA0620遺伝子導入細胞由来蛋白質が含まれる。その他のサンプルとして、マウスKIAA0620蛋白質のV5融合蛋白質型を発現する発現ベクターを導入したHEK293T細胞を使用し、上記と同様な方法でサンプル液を調製した。各種サンプル液をポリアクリルアミドゲル電気泳動(PAGE)にて分画した。ポリアクリルアミドゲル電気泳動は、ポリアクリルアミドゲルの各レーンに約20マイクログラムの各種遺伝子導入細胞由来蛋白質をアプライして電気泳動で分画し、次に分画した蛋白質をメンブレンにプロットし、プロットしたメンブレンに対し500または1000倍希釈した抗体を用いて免疫染色反応を行った。すなわち、ポリアクリルアミドゲル電気泳動はInvitrogen社製の4-12% Tris-Glycine Gel(#No. EC6035Box)を用いて行い、BioRad社製のセミドライ式トランスファーセルを用いて蛋白質を転写し、メンブレンにプロットした。二次抗体には5000倍希釈したBiosource社製Goat Anti-Rabbit IgG, HRP-conjugate 抗体(#No. ALI0404)を用い、検出には同社のECL Western blotting Detection Reagents

(#No. RPN2133)を用いた。分子量を知る目的でナカライテスク社製のプレスティンDタンパク質マーカー (High Range, SDS-PAGE (#No. 26039-75))を各サンプルとともに電気泳動した。

[0116] まず、マウスKIAA0620蛋白質のV5融合蛋白質型を発現する発現ベクターを導入したHEK293T組換え細胞あるいはその他の組換え細胞を出発材料としたメンブレンにおいて、抗V5-HRP抗体(5000倍希釈で使用)を用いたウエスタンブロッティング法による検出実験においては、抗V5-HRP抗体によりマウスKIAA0620-V5融合蛋白質のサイズ(約220kDa)に一致する位置に明瞭な単一バンドを検出することが出来た。検出したバンドの分子量が、マウスKIAA0620-V5融合蛋白質の理論上の分子量と一致することから、マウス完全長KIAA0620蛋白質がV5融合蛋白質として発現していることが確認出来た。

[0117] 次に、マウスKIAA0620蛋白質のV5融合蛋白質型を発現する発現ベクターを導入したHEK293T組換え細胞あるいはコントロールとして使用した組換え細胞を出発材料としたメンブレンにおいて、上記で得られた精製ウサギポリクローナル抗体(抗mKIAA0620抗体)を500倍、1,000倍希釈して用いた検出系においては、マウスKIAA0620-V5融合蛋白質のサイズ(約220kDa)に一致する位置に明瞭なバンドが検出された。一方、約220kDa以外にも数本のバンドがより低分子量の位置に検出された。それらの数本のバンドがマウスKIAA0620-V5融合蛋白質に起因するかどうかはこの実験からは明らかでない。マウスKIAA0620は膜貫通部分を含むのでサンプル調製の過程において、十分に可溶化されずに膜画分に残り可溶性画分には含量が少なく認められた分子量の低い数本のバンドに比較して見かけ上少ない含量として検出された可能性もある。これにより、作製したポリクローナル抗体が目的とするmKIAA0620蛋白質融合蛋白と反応し、本発明のポリクローナル抗体(抗mKIAA0620抗体)がmKIAA0620蛋白質アミノ酸配列を検出するのに有用と判断された。尚、以上の結果は図6に示す。

[0118] (8)in situ ハイブリダイゼーション法を用いた新生仔網膜血管に於けるマウスKIAA0620遺伝子発現の時間的・空間的同定

マウス胎仔網膜血管におけるマウスKIAA0620遺伝子のmRNAレベルでの時間的・空間的発現を解析した。フォワードプライマーの配列を5'-CCCCGGAAGTTGAACGTGTC-3' (配列番号:3)、リバープライマーの配列を5'-CCACCTGTTCAAAGTTGTGCTG-3' (配列番号:4)とし、それらのプライマーを用いてマウスmpf00920遺伝子の転写産物をPCR法で増幅すると、アンチセンスあるいはセンスプローブとして働く各々約1,069塩基長(bp)のDNA断片が得られる設計にした。目的とするPCR産物、すなわちアンチセンスあるいはセンスプローブ用の約1,069(bp) DNA断片をPromega社が供給するT-vectorにクローン化した。T-vectorにクローン化した1,069(bp) DNA断片を鋳型とし、RNA 合成酵素 (Roche社、DIG RNA Labeling Kit)を用いてRoche社が示す方法によりマウスmpf00920遺伝子発現産物を検出可能とするアンチセンスcRNA プローブ及び陰性コントロール用として使用するセンスcRNA プローブを作製し、新生仔ICRマウスより摘出した網膜におけるマウスKIAA0620 遺伝子の発現を網膜フラットマウントin situ ハイブリダイゼーション法により観察した。また、抗マウス4型コラーゲン抗体 (LSL社、ウサギポリクローナル抗体)を用いた免疫染色法を同一サンプルにて行い、網膜血管網の観察を同時に行ない血管に沿ってマウスKIAA0620 遺伝子発現が認められることを確認した。これらの実験結果から、新生仔マウス(生後2ないし4日)網膜における発達途上の血管では、特に新生血管先端部位の内皮細胞においてマウスKIAA0620遺伝子発現が非常に強く認められた。これに対し、生後7日マウス網膜では、マウスKIAA0620遺伝子発現は網膜周辺部における血管新生部位に認められるのみで、すでに血管が形成されている網膜中心部では、当該遺伝子の発現が著しく消退していることが認められた(図7)。

[0119] (9) 本発明遺伝子の機能推定

本発明のポリペプチド配列についてモチーフ検索を行った結果、Semaphorin/CD100 antigenドメイン、3つのPlexin/Semaphorin/integrinドメイン、及び3つのCell surface receptor IPT/TIGを有し、かつC-末端側に膜貫通(TM)セグメントが存在する構成である、全く新しいタイプの齧歯類由来新規Plexinポリペプチドといえる。

[0120] PlexinファミリーにはPlexin-A(タイプA1、タイプA2、タイプA3、及びタイプA4)、

Plexin-B(タイプB1、タイプB2、及びタイプB3)、Plexin-C1、Plexin-D1と4つのサブファミリーに分類されること、PlexinAはセマフオリン1aの機能的な受容体として、PlexinB1は膜貫通セマフオリンSema4D(CD00)の受容体として、Plexin-C1はGPIがアンカーしたセマフオリンSema7A(Sema-K1)の受容体として働くことが報告されている(Tamagnone L, Artigiani S, Chen H, He Z, Ming GI, Song H, Chedotal A, Winberg ML, Goodman CS, Poo M, Tessier-Lavigne M, Comoglio PM., 2001, Cell, 99:71-80)。更に、Plexinファミリーに属するPlexin蛋白質は、分子量が大きな膜貫通型の蛋白質であり、膜外の特徴的なシステインに富むドメインを含有する。その受容体としては、セマフオリンあるいはニューロフィリンが知られている。セマフオリンは、神経系において神経軸索ガイダンスの反発として影響を与えること、また、血管や筋肉の発達、免疫反応、血管新生、腫瘍の成長や転移に影響を与えることが報告されている。特に、Plexin-Aは運動神経あるいはCNS(Central Nervous System)の神経軸索ガイダンスを調節することが知られている。

- [0121] 本発明のポリペプチドはヒトPlexin-D1に比較的高いホモロジーを有し、Plexinファミリーに共通して認められる膜外に位置するsemaドメイン、システインに富むMRSモチーフ、及びSPドメインといわれるplexinに特徴的な膜内ドメインが全て認められる。特にシステインに富むMRSモチーフのコンセンサス配列はC-X(5-6)-C-X(2)-C-X(6-8)-C-X(2)-C-X(3-5)-Cで、本発明の配列には1つの完全なMRSモチーフともう1つの不完全なMRSモチーフが認められた。これらの特徴的構造を有するPlexin蛋白質は、軸索ガイダンスに重要な役割を持ち、形態形成(morphogenesis)や病気に起因する現象(癌の侵襲や転移)に関係するので重要である(Tamagnone, L. et al., 2001, Cell, 99:71-80)。従って、本発明のポリペプチドも血管新生等に必要なガイダンスに重要な役割を持ち、脈管形成(vasculogenesis)、及びそれから一連の血管構築過程を経ることにより完成する血管新生(angiogenesis)や病気に起因する現象(癌の侵襲や転移)と深く関わるので動物の個体維持にとって重要である。例えば、脳・神経系においてはNeuropilinと共同してSemaphorinと結合することによって、あるいは血管形成においてはNeuropilinと共同してVEGFと結合することによって文献16,17)、本発明の新規Plexinポリペプチドが神経や血管内皮の増殖・



分化を新規なシグナル伝達系を介して調節する可能性が容易に考えられる。

- [0122] また、mpf00920遺伝子の成体に於ける組織特異的発現パターンから、本発明のポリペプチドは個体発生過程の血管形成を担う役割のみならず各種組織における細胞の重要な機能に係わっていると類推される。これらを総合すると、本発明の新規Plexinポリペプチドは、主に発生初期には血管発生、分化過程に関与するが、その他にも成体においては管空構造を有する組織、細胞つまり胃腺、子宮腺、尿細管と言った細胞の重要なプロセスを担う新規ポリペプチドであり、それら重要機能に関わる各種臓器における生体内の複合蛋白質の中心をなしているといえる。
- [0123] 更に、mpf00920遺伝子由来の該遺伝子発現検出用プローブは、齧歯類等における個体発生時の血管内皮細胞(Flk-1陽性細胞：文献1,10,12,14)を特異的に染色するので、血管新生(angiogenesis)におけるごく初期の時期(内皮細胞の増殖・分化の時期)から、出現する血管内皮細胞(Flk-1陽性細胞)を検出可能である。血管新生における次の段階(内皮細胞の形態形成及び動脈、静脈への分化の時期)では、構成する内皮細胞がFlt-1陽性(Flt-1陽性細胞：文献1,10)となるがこの時期にも本発明の遺伝子は発現している。また、本発明の遺伝子がコードするポリペプチドは細胞膜受容体構造を持つため、そのリガンドは新規血管誘導因子である可能性が予測され、該ポリペプチドあるいはそれに対応する抗体は、予測される血管誘導因子を探索するためのツールとして利用可能である。
- [0124] これまでに、ヒトKIAA0620遺伝子に関連する齧歯類に由来するラット、マウスあるいはハムスター等、とりわけマウス由来Plexin様ポリペプチドをコードする新規DNAの取得がなされた例がない。また、新規Plexinアミノ酸配列をコードする本発明の遺伝子配列は、mRNAレベルでの発現頻度解析の結果、個体発生時の血管形成時期の初期から血管形成時期全般を通して血管特異的に発現し、成長後の成体では胃・重層扁平上皮に於いて強い発現、子宮に於いてやや強い発現が、また脳をはじめとした各種臓器に於いて発現していることが今回初めて見出され、本発明の遺伝子がコードする蛋白質が、血管形成時期の初期から血管形成時期全般を通して血管特異的に、また成体では多くの組織に於いて細胞の増殖・分化を制御する重要な働きに関わっている可能性が示された。

- [0125] 本発明の新規ポリペプチドをコードする遺伝子は、特に血管形成時期の初期から血管形成時期全般を通して血管特異的発現と、成長後の成体に於いては各種臓器で発現していることを特徴とし、本発明のポリペプチドは新規なポリペプチドであり、それら組織に於いて発育、機能保全、あるいは全身の臓器に関わる病態（例えば癌化・老化・機能不全）解明、それによる予防薬、治療薬、検査薬の開発に有用であることが明らかで、それが本発明の優れた点である。また、本発明の組換え蛋白質、あるいは組換え蛋白質を発現する組換え体を利用することにより、アゴニスト、アンタゴニストのスクリーニングあるいはドラッグデザイン研究に利用できる点が優れている。
- [0126] 更に、mpf00920遺伝子は、齧歯類等における個体発生時の血管内皮細胞(Flk-1陽性細胞：文献1,2,3,10,12,14)あるいは血管内皮細胞の前駆細胞から血管内皮細胞に分化する途中の細胞の新規な分子マーカーとして有用であること、また、該遺伝子がコードするポリペプチドは細胞膜受容体構造を持つため、そのリガンドは新規血管誘導因子である可能性が予測され、該ポリペプチドあるいはそれに対応する抗体は、予測される血管誘導因子を探索するためのツールとして有用である。
- [0127] ヒトKIAA0620遺伝子のヒトにおけるmRNAレベルの発現について知見はないが、同遺伝子とハイブリダイズするmRNAがマウス発生過程での血管内皮細胞あるいは中枢神経系(CNS)でmRNAが発現していることが報告されたが(van der Zwaag, B. et al., Dev. Dyn., 2002, 225:336-343)、本発明のmpf00920遺伝子は、個体発生時の血管形成時期の初期から血管形成時期全般を通して血管特異的に発現し、成長後の成体では胃・重層扁平上皮に於いて強い発現、子宮に於いてやや強い発現が、また脳をはじめとした各種臓器に於いて発現していることから、特に血管新生において、また、脳をはじめとする各種臓器において、発育、機能保全、あるいは各種臓器における血管新生が関係する病態や老化、機能不全、あるいは先天奇形など分化異常を含めたヒト疾患の機序解明及び診断・治療薬、検査薬の開発に有用である。本発明の組換え蛋白質、あるいは組換え蛋白質を発現する組換え体を利用することにより、アゴニスト、アンタゴニストのスクリーニングあるいはドラッグデザイン研究に利用できる。
- [0128] このように血管内皮の増殖・分化や老化に極めて重要なヒトKIAA0620遺伝子に関

連する齧歯類に由来するラット、マウスあるいはハムスター等、とりわけマウス由来 Plexin様ポリペプチドをコードする遺伝子は、それ自身も直接疾患原因遺伝子となりうる。本発明のPlexin様ポリペプチドについては、以下の疾患原因となりうるものが容易に推察される。

[0129] 例えば、各種臓器における血管新生が関係する病態(例えば傷治癒、骨折治癒、血管閉塞と側副血行路形成等、また、血管新生過程が関与しそれが望ましくない癌増殖、慢性関節リュウマチ、糖尿病性網膜症、子宮内膜症、肥満、また、血管新生過程が望ましい心臓発作、神経変性疾患、足の血行障害、閉塞性動脈硬化症、尋常性乾癬等の疾患原因となりうる。

[0130] 本発明の本発明のマウスmKIAA0620ポリペプチドのアミノ酸配列、それをコードする核酸配列、該アミノ酸配列に特異的に結合する抗体を応用することにより有用性を発揮できる医療分野は、血管新生と病態との関わりがある次のような分野である。すなわち、成長後に於いて正常な血管新生過程に関わる傷治癒、骨折治癒、血管閉塞と側副血行路形成、子宮粘膜での周期的血管網形成(一過性、黄体形成時)等に於ける血管増殖・分化調節因子あるいは薬剤の、また、血管新生過程が関与しそれが望ましくない癌増殖、慢性関節リュウマチ、糖尿病性網膜症、子宮内膜症、肥満、また、血管新生過程が望ましい心臓発作、神経変性疾患、足の血行障害、閉塞性動脈硬化症、尋常性乾癬といった各種病気に於ける、血管増殖・分化調節因子あるいは薬剤の研究開発に関係する分野である(文献1,4,5,7,11)。特に、癌増殖については癌組織での新生血管形成に関与していることが想定されるので、本発明により製造可能となるツールを使用することにより、エンドスタチン、アンジオスタチン(文献6,7)に代表される生体内でつくられる固形癌増殖を停止せしめる能力がある各種増殖阻害因子、あるいは受容体ブロッカー、細胞外結合部位に対するモノクローナル抗体等、特異的血管新生を阻害する増殖阻害因子、薬物が見出されれば抗癌剤として使用が可能となる。また、再生治療において血管芽細胞の単離用蛋白あるいは抗体、また単離した血管芽細胞増殖(文献1,2,3,14)に関連する増殖因子、増殖阻害因子の新規スクリーニング系に使用可能である。

[0131] ヒトKIAA0620蛋白質、あるいはPlexinファミリーD1にホモロジーを有する、本発明の

マウスmKIAA0620ポリペプチドのアミノ酸配列、それをコードする核酸配列、該アミノ酸配列に特異的に結合する抗体を使用することにより、目的とするマウス等齧歯類遺伝子あるいは遺伝子産物等を利用した、血管増殖分化制御因子、あるいは制御合成化合物のスクリーニング方法、及び測定キット、言い替えると組換え蛋白質を用いて相互作用検出系作製、アゴニスト・アンタゴニスト・生体内リガンド検索系作製を、また遺伝子導入細胞、動物遺伝子導入動物を作製することによってin vitro またはin vivo病態モデルを作製し、該遺伝子の発現を制御する化合物を組換え細胞、組換え動物で評価したりすることが可能となり、血管細胞増殖分化制御、癌増殖を支持する血管増殖阻害に関わる研究が遺伝子を変異させた病態モデル動物を作製することが可能となる。また、作製した組換え細胞、マウス等病態モデル動物変異動物を利用することにより、アゴニスト、アンタゴニストのスクリーニングあるいはドラッグデザイン研究に利用点が優れている。さらに、本発明のポリペプチドのアミノ酸配列、それをコードする核酸配列、該アミノ酸配列に特異的に結合する抗体を使用することによりの血管細胞増殖分化制御、癌増殖を支持する血管増殖阻害機構の解明、それによる予防薬、治療薬、検査薬の開発に有用であることが明らかで、それが本発明の優れた点である。

[0132] (10) KIAA0620全長ポリペプチド及び膜外領域の組換え細胞による強制発現

段落番号0079で記載したように、SOSUIという汎用transmembrane(TM)segment検索プログラムにより検索すると、配列番号:1に示されるアミノ酸配列のうちN-末端側から1,090-1,112番目(配列番号15ではN-末端側から1,341-1,363番目)にETAIVVSIVICSVLLLLSVVALFで示される膜貫通(TM)セグメントが見出された。膜貫通(TM)セグメントの存在により、本発明のポリペプチドが膜蛋白質であることが推察されたが、実際に以下の実験の結果から膜蛋白質であることを確認した。

[0133] まず、マウスKIAA0620全長-V5融合蛋白質の哺乳類細胞を宿主とする強制発現ベクターを構築した。即ち、段落番号1110で示した様に、Forward primerは(CACCatgggctgtgggcgtggtct, 24塩基長, 配列番号:16の6番目から25番目の20塩基長配列を含む24塩基長配列:配列番号12)をReverse primerはReverse primer2(GGCCTCGCTGTAACACTCATAGA, 23塩基長, 配列2の5,218番目から5,240番目

の23塩基長配列に対する相補的配列、終始コドンを含まない、また、配列番号15では5,971番目から5,993番目である23塩基長の配列(配列番号14)を使用して作製したエントリークローンをを用い、LR Clonase酵素ミックス(Invitrogen: Cat.No.11791-019)を用いた部位特異的組換え反応により発現用デステイネーションベクター( pcDNA-DEST40 vector、pEF5/FRT/V5-DEST vector:前者はCMVプロモーター、後者はEF-1  $\alpha$  プロモーター制御下にて発現するプラスミドベクター)へ組換えることで、配列番号1に示される本発明のポリペプチドのN末端側に更に250個のアミノ酸(配列番号11のN-末端側の1番目Gluを除いた2番目から251番目までのアミノ酸数250の配列)が付加されたアミノ酸配列(配列番号15におけるN-末端側の1番目Gluを除いた2番目から1,997番目のアミノ酸数1,996の配列)をコードした、マウス KIAA0620全長-V5融合蛋白質の哺乳類細胞を宿主とする強制発現ベクターを構築した。

[0134] 次に、配列番号15における第2番目〜1,363番目の1,362個のアミノ酸配列から成る膜外領域と膜貫通(TM)部分を含むポリペプチドをコードした、マウスKIAA0620膜外領域(TM)-V5融合蛋白質の哺乳類細胞を宿主とする強制発現ベクターを、マウス KIAA0620全長-V5融合蛋白質の哺乳類細胞を宿主とする強制発現ベクターと同様に、LR Clonase酵素ミックス(Invitrogen: Cat.No.11791-019)を用いた部位特異的組換え反応により発現用デステイネーションベクター( pcDNA-DEST40 vector、pEF5/FRT/V5-DEST vector:前者はCMVプロモーター、後者はEF-1  $\alpha$  プロモーター制御下にて発現するプラスミドベクター)へ組換えることで、構築した。

[0135] 構築したマウスKIAA0620全長-V5融合蛋白質発現プラスミドベクター及びマウス KIAA0620膜外領域(TM)-V5融合蛋白質発現プラスミドベクター(どちらも目的遺伝子をクローニングしたFlp-In 用発現ベクター、インビトロジェン社が供給する pEF5/FRT/V5-DEST由来)をヒト胎児由来腎細胞(HEK293T細胞)に遺伝子導入し、KIAA0620全長ポリペプチドあるいは同膜外領域の遺伝子導入強制発現細胞を作製した。

[0136] すなわち、10%ウシ胎児血清を添加したDMEM培地で満たした6ウェルプレートを使用し、水蒸気で飽和せしめた5%CO<sub>2</sub>を添加した空気を気相とし、37℃で保温する

炭酸ガスインキュベーターを使用して、HEK293宿主細胞をサブコンフルエントとなるまで培養した。次に、マウスKIAA0620全長-V5融合蛋白質発現プラスミドベクター又はマウスKIAA0620膜外領域(TM)-V5融合蛋白質発現プラスミドベクター2  $\mu$ gに対してトランスフェクション液(ロッシュ社が供給するFuGENE6 Transfection Reagent溶液)を3  $\mu$ L用いて、それぞれ2ウェルずつ形質転換の処理を行った。コントロールの2ウェルはプラスミドベクターなしのトランスフェクション液(FuGENE6 Transfection Reagent溶液)で処理して培養を継続した。

[0137] 形質転換の処理後、2日間培養した合計6ウェルから細胞を回収して、それぞれ2通りの方法を適用して蛋白質を調製した。まず、全蛋白質を調製するためにSDSサンプルバッファーを用いて定法にて可溶化し、6つのウェルのうち3つのウェルにあたるそれぞれの細胞由来全蛋白質を得た。

[0138] 次に、PIERCE biotechnology社が提供するMem-PER Eukaryote Membrane protein Extraction Kit を用い、同社が示す条件に従い全蛋白質を調製し、その全蛋白質を材料にして疎水性蛋白質画分を分離して抽出した。これにより、3つのウェルからそれぞれの細胞由来の全蛋白質、PIERCE biotechnology社の膜蛋白質画分キットによる全蛋白質及び膜蛋白質画分を得た。得られたマウスKIAA0620全長-V5融合蛋白質発現ベクターで形質転換した組換え細胞由来、マウスKIAA0620膜外領域(TM)-V5融合蛋白質発現ベクターで形質転換した組換え細胞由来、あるいはコントロール細胞由来である2通りの調製法により取得したそれぞれの蛋白質画分について、上記(7-2)と同様に、SDS-ポリアクリルアミド電気泳動法でサイズ分画し、V5タグを認識する抗V5モノクローナル抗体(インビトロジェン社; V5-HRP, R961-25又はV5, R960-25)とECLキット(Amersham社)を用いた化学発光法、あるいは、それらの抗体を用いた通常の発色法によるウエスタンブロット法を用いて目的とする組換え蛋白質の検出を行った。その結果、コントロール細胞では細胞由来全蛋白質画分、PIERCE biotechnology社の膜蛋白質画分キットによる全蛋白質及び膜蛋白質画分の全ての画分で目的とする組換え蛋白質は検出されなかった。一方、マウスKIAA0620全長-V5融合蛋白質発現ベクターで形質転換した組換え細胞に於いては細胞由来全蛋白質画分に、また、マウスKIAA0620膜外領域(TM)-V5融合蛋白質発現ベクターで

形質転換した組換え細胞に於いても細胞由来全蛋白質画分に、それぞれ目的とする約200kDa付近あるいは140kDa付近にバンドが検出された。PIERCE biotechnology社の膜蛋白質画分キットによる全蛋白質画分に於いては、マウス KIAA0620全長-V5融合蛋白質発現ベクターで形質転換した組換え細胞では約200 kDa付近に、また、マウスKIAA0620膜外領域(TM)-V5融合蛋白質発現ベクターで形質転換した組換え細胞では約140kDa付近に弱いバンドが検出された。

[0139] そこで、PIERCE biotechnology社が提供するMem-PER Eukaryote Membrane protein Extraction Kit を用いて得られる全蛋白質画分とそれから更に分離調製した疎水性蛋白質画分の2種類の蛋白質画分について、上記と同様な方法により調製した各種細胞を材料とし、ウルトラフィльтраーション法による濃縮の工程を付加し調製して溶液中の蛋白濃度を高めた後に、上記と同様なウエスタンブロット法を用いた検出実験を行った。その結果、コントロール細胞では全蛋白質抽出画分とそれから更に分離調製した疎水性蛋白質画分の両方の画分で組換え蛋白質は検出されなかった。一方、マウスKIAA0620全長-V5融合蛋白質発現ベクターで形質転換した組換え細胞では、全蛋白質画分に目的とする約200kDa付近に明瞭なバンドが検出された。また、全蛋白質抽出画分から分離調製した疎水性蛋白質画分にも約200kDa付近に弱いバンドが検出された。マウス膜外領域と膜貫通(TM)部分を含むマウス KIAA0620膜外領域(TM) -V5融合蛋白質発現ベクターで形質転換した組換え細胞では、全蛋白質画分に140kDa付近に明瞭なバンドが検出された。又、全蛋白質画分から調製した疎水性蛋白質画分では約140kDa付近に弱いバンドが認められた。

[0140] マウスKIAA0620全長-V5融合蛋白質が全蛋白質画分及び疎水性蛋白質画分に検出されたことにより、KIAA0620蛋白質は膜貫通(TM)セグメントが確かに機能し、膜蛋白質として膜に局在していることを確認した。また、上記で示した膜外領域と膜貫通(TM)部分を含むポリペプチドを組換え蛋白質として人工的に作製したものは膜貫通(TM)部分を含むため、期待通り、全蛋白質画分及び疎水性蛋白質画分の双方に存在している結果が得られた。PIERCE biotechnology社が提供するMem-PER Eukaryote-Membrane protein Extraction Kitの疎水性蛋白質と親水性蛋白質の溶媒

による分配条件では、本発明のポリペプチドは1ヶ所の膜貫通領域(TM)を含むにも拘わらず疎水性蛋白質画分に必ずしも多く分配される結果とはならなかった。しかしながら、以上の結果から、作製したマウスKIAA0620全長-V5融合蛋白質発現ベクター及びマウスKIAA0620膜外領域(TM)-V5融合蛋白質発現ベクターは哺乳類細胞を宿主として組換え蛋白質を産生すること、また、マウスKIAA0620全長-V5融合蛋白質が確かに疎水性蛋白質画分に存在していることが示された。尚、以上の結果は図8に示す。

[0141] (11) KIAA0620全長ポリペプチド及び膜外領域の組換え細胞による強制発現  
上記(10)と同様に、各エントリークローンをLR Clonase酵素ミックス(Invitrogen: Cat.No.11791-019)を用いた部位特異的組換え反応により発現用デステイネーションベクター (pcDNA-DEST40 vector、pEF5/FRT/V5-DEST:前者はCMVプロモーター、後者はEF-1  $\alpha$  プロモーター制御下にて発現するプラスミドベクター)へ組換えて発現ベクターの構築を行い、マウスKIAA0620全長ネイティブ蛋白質、及びマウスKIAA0620全長-V5、マウスKIAA0620膜外領域-V5、マウスKIAA0620全長-GFP、マウスKIAA0620膜外領域-GFP、マウスKIAA0620全長-DsRed、マウスKIAA0620膜外領域-DsRed、マウスKIAA0620全長-ヒトIgG1Fc断片、マウスKIAA0620膜外領域-ヒトIgG1Fc断片融合蛋白質型の哺乳類細胞での強制発現ベクターを構築した。これらをTransfection 試薬 (Fugene6; Roche社)を用いてヒト胎児由来腎細胞(HEK293細胞)に遺伝子導入し、遺伝子導入細胞を作製し、それぞれの融合蛋白質の発現を以下のようにして確認した。

[0142] まず、マウスKIAA0620全長又は膜外領域蛋白質のV5融合蛋白質型を発現する発現ベクターを導入したHEK293組換え細胞あるいはその他の組換え細胞を出発材料としたメンブレンにおいて、上記(10)と同様に、抗V5-HRP抗体を用いたウェスタンブロットニング法による検出実験を行い、抗V5-HRP抗体によりマウスKIAA0620全長-V5融合蛋白質のサイズ(約200kDa)又はKIAA0620膜外領域-V5融合蛋白質のサイズ(約140kDa)に一致する位置に明瞭な単一バンドを検出することが出来た。検出されたバンドの分子量が、マウスKIAA0620全長又は膜外領域-V5融合蛋白質の理論上の分子量と一致することから、マウスKIAA0620完全長又は膜外領域蛋白質が



V5融合蛋白質として発現していることが確認出来た。

- [0143] 同様に、マウスKIAA0620全長又は膜外領域蛋白質のGFP、DsRed、及びヒトIgG1Fc断片融合蛋白質型を発現する発現ベクターを導入したHEK293組換え細胞あるいはその他の組換え細胞を出発材料としたメンブレンにおいて、抗GFPマウスモノクローナル抗体(ナカライテスク社、品番04363-24)、又は抗DsRedウサギポリクローナル抗体(BD Biosciences Clontech社、品番632397)、抗ヒトIgG1Fcマウスモノクローナル抗体(CHEMICON International, Inc社、品番MAB1302)を用いたウエスタンブロッティング法による検出実験を行い、それぞれの抗体によりそれぞれの融合蛋白質のサイズに一致する位置に明瞭な単一バンドを検出することが出来た。検出されたバンドの分子量が、それぞれの融合蛋白質の理論上の分子量と一致することから、マウスKIAA全長0620蛋白質及びマウスKIAA0620膜外領域蛋白質がそれぞれのタグの融合蛋白質として発現していることが確認出来た。

- [0144] (12) 遺伝子発現安定株の作成

構築したマウスKIAA0620全長又は膜外領域-GFP融合蛋白質発現プラスミドベクター(目的遺伝子をクローニングしたFlp-In 用発現ベクター、インビトロジェン社が供給するpEF5/FRT/V5-DEST由来)、及びマウスKIAA0620全長又は膜外領域-DsRed融合蛋白質発現プラスミドベクター(目的遺伝子をクローニングしたFlp-In 用発現ベクター、インビトロジェン社が供給するpEF5/FRT/V5-DEST由来)をそれぞれインビトロジェン社が供給するFlp-in発現システムを用いて、ヒト胎児由来腎細胞(HEK293細胞)に遺伝子導入し、KIAA0620全長ポリペプチドあるいは同膜外領域の遺伝子導入強制発現安定株を作製した。

- [0145] すなわち、10%ウシ胎児血清を添加したDMEM培地で満たした6ウェルプレートを使用し、水蒸気で飽和せしめた5%CO<sub>2</sub>を添加した空気を気相とし、37℃で保温する炭酸ガスインキュベーターを使用して、HEK293宿主細胞(インビトロジェン社が供給するFlp-in-293 細胞:293 human embryonic kidney cells由来で、転写されうるゲノムの位置にFlpリコンビナーゼ標的部位(FRT部位)が1ヶ所だけ存在する)をサブコンフルエントとなるまで培養した。

- [0146] 次に、マウスKIAA0620全長又は膜外領域-GFP融合蛋白質発現プラスミドベクター

、又はマウスKIAA0620全長又は膜外領域-DsRed融合蛋白質発現プラスミドベクターマウス2  $\mu$  gに対してトランスフェクション液(ロッシュ社が供給するFuGENE6 Transfection Reagent溶液)を3  $\mu$  Lを用いてそれぞれ2ウェルずつ形質転換の処理を行った。コントロールの2ウェルはプラスミドベクターなしのトランスフェクション液(FuGENE6 Transfection Reagent溶液)で処理して培養を継続した。

[0147] 形質転換の処理後、2日間培養とそれに続くハイグロマイシンB (200/micro g/ml) 選択培地を用いた約10日間の選択圧をかけた培養が終了した後に、各々のウェルで増殖したそれぞれの形質転換細胞を、融合している蛍光タンパク(GFP又はDsRed)の発色があるものについて、FACSでソーティングを行い、導入した遺伝子を安定に発現する細胞だけを集めた安定株を作製した。

[0148] (13) マウスKIAA0620蛋白質の膜外部分-IgG1Fc融合蛋白質を用いた新生仔マウス網膜血管発生における本発明のポリペプチド機能解析

配列番号:18に示される1,337個のアミノ酸配列(配列番号:15に示されるアミノ酸配列の第2番目から第1,338番目と同一)からなる膜外領域ポリペプチドとヒトIgG1Fc断片領域と遺伝子組換え法を用いて融合し、さらにこの遺伝子産物をCAGプロモーター制御下にて発現するプラスミドベクターを作製した。これをMirus社TransIT-LT1 Transfection Reagentsを用いて293T細胞に遺伝子導入し、無血清培地(Invitrogen社Gibco CD293)にて3日間培養した後、ProteinGカラム(Amersham Biosciences社、HiTrap(商標)Protein G HP)を用いて培養上清からマウスKIAA0620膜外部分-IgG1Fc融合蛋白質を精製した。

[0149] このようにして得られた融合蛋白質溶液(リン酸緩衝液中2.3 mg/ml)を、ガラス毛细管を装着したマイクロインジェクター(Drummond社、NANOJECT II, Drummond Scientific Co., Broomall, Pennsylvania, USA)を用いて新生仔ICRマウス(生後1、3、ないし5日)眼球内に500 nl注入した。また、同濃度のヒトIgG1Fc fragment (Jackson ImmunoResearch Laboratories, West Grove, Pennsylvania, USA)を同様の方法により眼球内に注入したサンプルをコントロールとして用いた。各眼球サンプルは抗マウスPECAM-1モノクローナル抗体(BD Pharmingen社、Mec13.3)を用いた網膜フラットマウント蛍光免疫染色法により、網膜血管の変化を観察した。観察にはAxioplan2蛍光

顕微鏡およびAxiovision3.0ソフトウェア(Carl Zeiss Co.,Ltd., Oberkochen, Germany)を用い、また共焦点顕微鏡システムによる画像観察にはAxiovert200M レーザー顕微鏡およびLSM510-V3.2ソフトウェア (Carl Zeiss Co.,Ltd., Oberkochen, Germany)を使用した。

- [0150] その結果、眼球注射5時間後には、発達途上の網膜血管、特に血管新生先端部の内皮細胞において過剰な糸状足形成が認められ(図9)、さらにその2日後および3日後(図10)には、網膜血管網の正常な構築が著しく障害されていることを見いだした。これに対し、陰性コントロールとなるIgG1Fc蛋白質単独の眼内注射では全く変化がみられなかった(図9、図10)。

#### 産業上の利用可能性

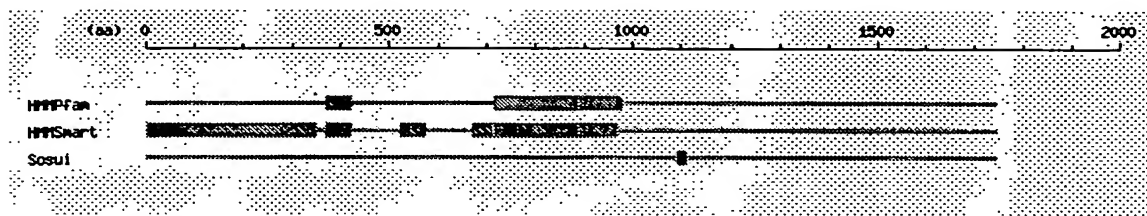
- [0151] これまでに記載したことから、本発明のDNA、本発明のポリペプチドあるいは本発明の抗体は、血管新生において、あるいは脳をはじめとする各種臓器において、発育、機能保全、あるいは各種臓器における血管新生が関係する疾患や老化、機能不全、あるいは先天奇形など分化異常を含めたヒト疾患の機序解明及び診断・治療上、また、各種臓器の機能保全や老化の防止に必要な役割を果たすと考えられる。また、mRNAレベルでの発現頻度解析による各組織及び発生段階での発現のパターン情報は、各種臓器に普遍的に発現していること、及び各発生過程に於いて普遍的に発現していることを明らかとし、本発明の遺伝子が各種臓器の発生・分化やその機能保全また老化において重要性であること明らかにした。
- [0152] 従って、本発明のDNA及び該DNAを含む齧歯類由来遺伝子、それらがコードするポリペプチドの一部又は全長、該ポリペプチドの一部又は全長に対する抗体、アンチセンスDNA等は、癌や先天奇形を含めたヒト疾患を治療する為のモデル動物であるマウスを用いた各種治療・予防方法開発において、医薬や検査薬として使用することが可能である。

## 請求の範囲

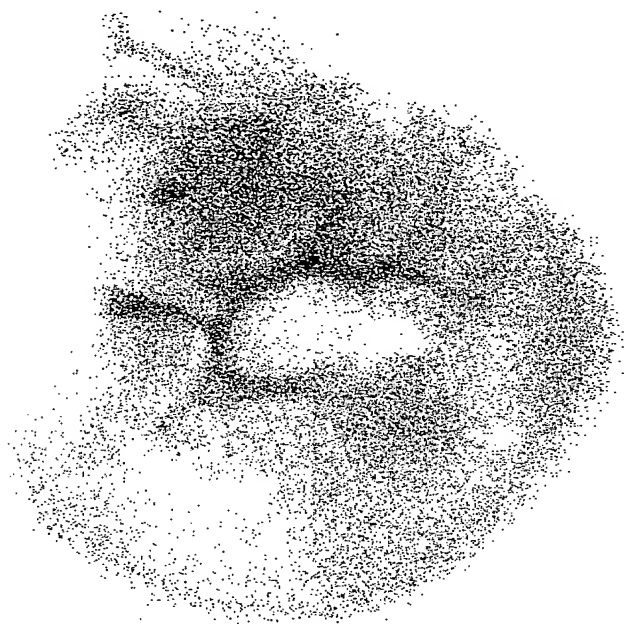
- [1] 以下の(a)又は(b)のポリペプチドをコードする塩基配列から成るDNA: (a)配列番号:1、配列番号:15又は配列番号18で示されるアミノ酸配列と同一又は実質的に同一のアミノ酸配列の一部又は全部から成るポリペプチド;又は(b)配列番号:1、配列番号:15又は配列番号:18で示されるアミノ酸配列において、一部のアミノ酸が欠失、置換又は付加されたアミノ酸配列から成り、(a)のポリペプチドと実質的に同質の生物学的活性を有するポリペプチド。
- [2] 以下の(a)、(b)又は(c)のDNA: (a)配列番号:2、配列番号:16又は配列番号19で示される塩基配列において、配列番号:1、配列番号:15又は配列番号:18で示されるアミノ酸配列の一部又は全部をコードするDNA; (b) (a)のDNAと相補的な塩基配列からなるDNAとストリンジントな条件下でハイブリダイズするDNA;又は(c) (a)のDNAと相補的な塩基配列からなるDNAとストリンジントな条件下でハイブリダイズし、(a)のDNAがコードするポリペプチドと実質的に同質の生物学的活性を有する蛋白質をコードするDNA。
- [3] 請求項1又は2記載のDNAを含む齧歯類由来遺伝子。
- [4] 齧歯類がマウスである請求項3記載の遺伝子。
- [5] 以下の(a)又は(b)のポリペプチド: (a)配列番号:1、配列番号:15又は配列番号:18で示されるアミノ酸配列と同一又は実質的に同一のアミノ酸配列の一部または全部から成るポリペプチド;又は(b)配列番号:1、配列番号:15又は配列番号:18で示されるアミノ酸配列において、一部のアミノ酸が欠失、置換又は付加されたアミノ酸配列の一部または全部から成り、(a)のポリペプチドと実質的に同質の生物学的活性を有するポリペプチド。
- [6] 請求項1若しくは2記載のDNA、又は請求項3若しくは4記載の遺伝子を導入した宿主細胞で作製される組換え蛋白質である、請求項5記載のポリペプチド。
- [7] 請求項1若しくは2記載のDNA、又は請求項3若しくは4記載の遺伝子を含む組換えベクター。
- [8] 請求項7記載の組換えベクターを導入した組換え動物細胞。
- [9] 請求項7記載の組換えベクターを導入した組換え動物。


- [10] 請求項5又は6記載のポリペプチドに特異的に結合する抗体。
- [11] 請求項1若しくは2記載のDNA、又は請求項3若しくは4記載の遺伝子を用いた、血管増殖分化制御因子又は血管増殖分化を制御する化合物のスクリーニング方法。
- [12] 請求項11記載のスクリーニング方法に使用する、遺伝子発現測定キット。
- [13] 請求項5又は6記載のポリペプチドを用いた、生体内血管増殖分化制御因子又は血管増殖分化を制御する化合物のスクリーニング方法。
- [14] 請求項13記載のスクリーニング方法に使用する、ポリペプチド結合物質測定キット。
- [15] 請求項8又は9記載の組換え動物又は組換え動物細胞を用いた、生体内血管増殖分化制御因子又は血管増殖分化を制御する化合物のスクリーニング方法。
- [16] 請求項15記載のスクリーニング方法に使用する、該分化制御因子、化合物の血管増殖分化制御活性測定キット。
- [17] 請求項10記載の抗体を用いた、血管増殖分化制御因子又は血管増殖分化を制御する化合物のスクリーニング方法。
- [18] 請求項17記載のスクリーニング方法に使用する、抗体力価測定キット。
- [19] 以下の(a)又は(b)のポリペプチド: (a) 配列番号:18で示されるアミノ酸配列と同一又は実質的に同一のアミノ酸配列の一部または全部から成るポリペプチド;又は(b) 配列番号:18で示されるアミノ酸配列において、一部のアミノ酸が欠失、置換又は付加されたアミノ酸配列の一部または全部から成り、(a)のポリペプチドと実質的に同質の生物学的活性を有するポリペプチドを活性成分として含む血管新生阻害剤。

[図1]



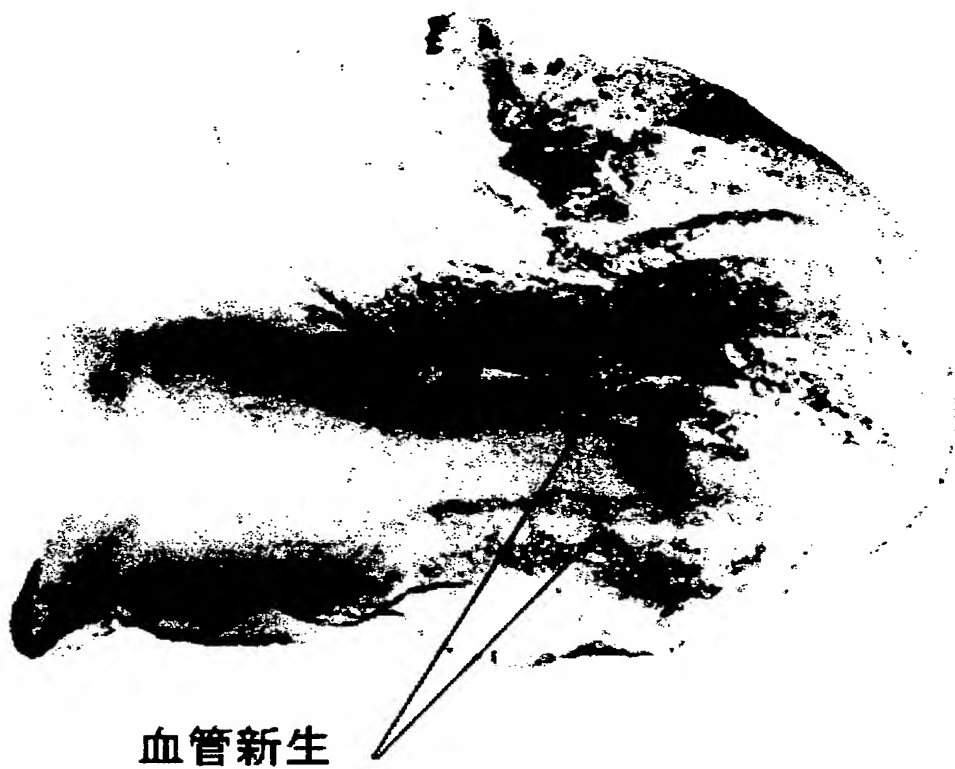
[図2A]



[2B]



[図2C]

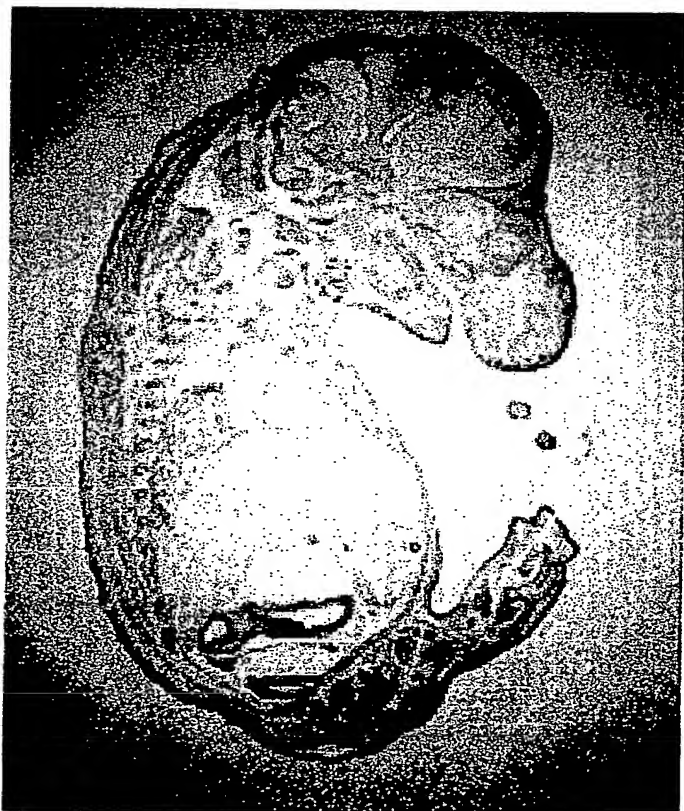
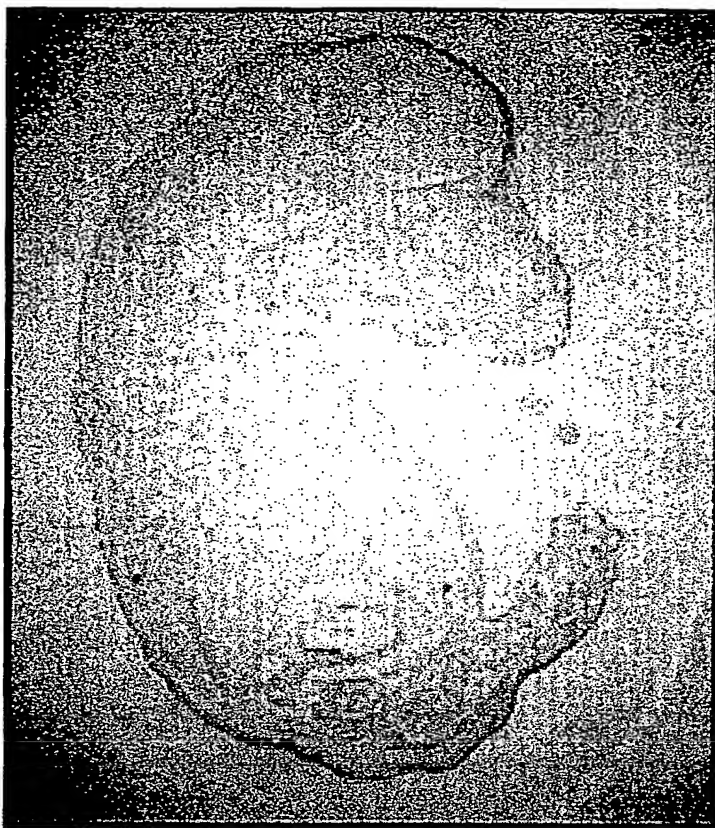


[図2D]





[図3A]



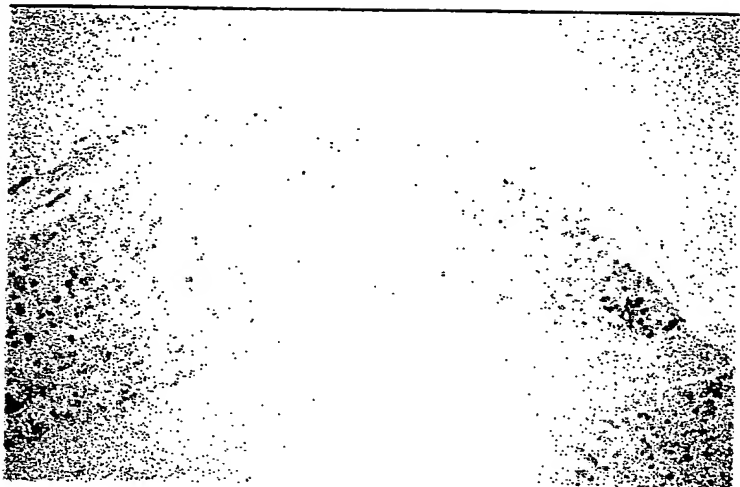
[図3B]



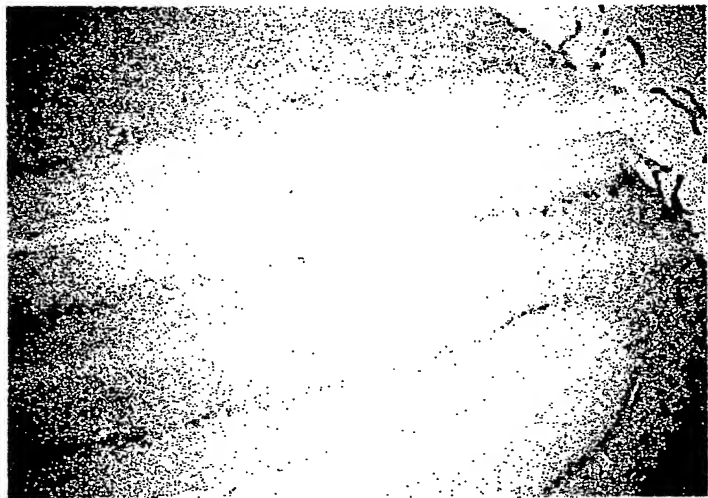
[図4A]













[図4B]



[図4C]

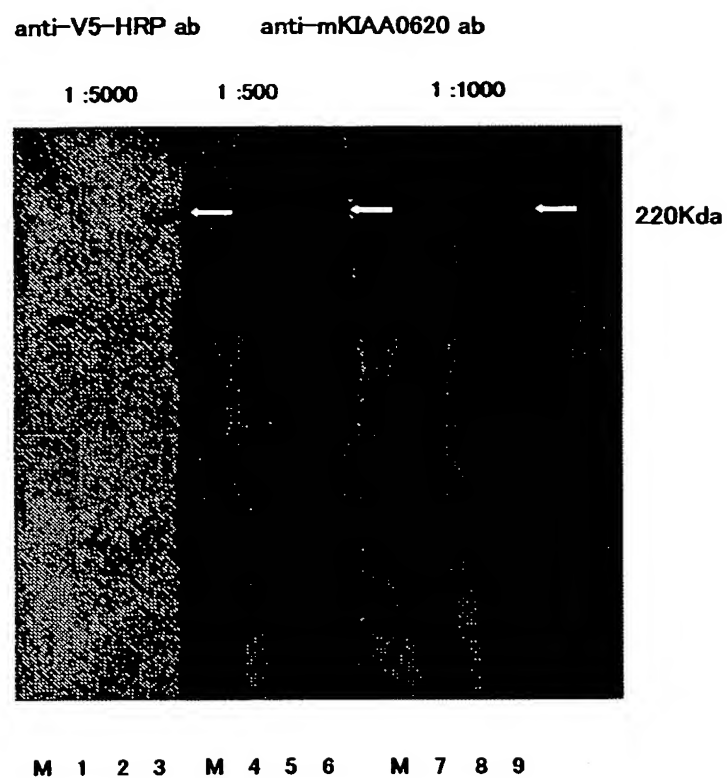


[図5]

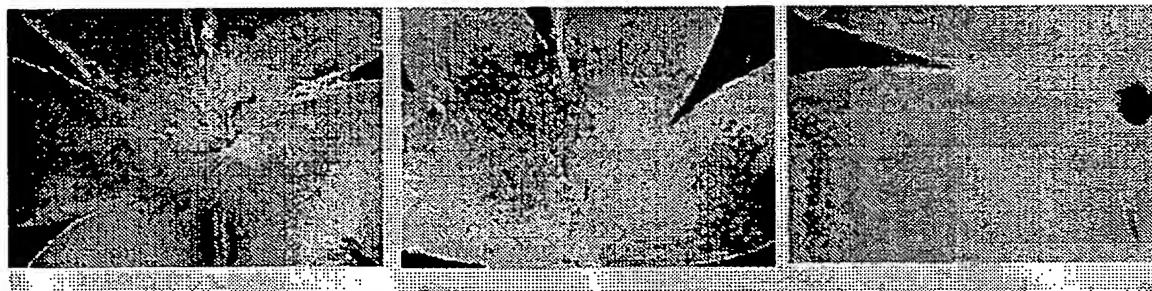
embryo (d.p.c.)	5.5	6.5	7.5	8.5	9.5
Flk					
mKlA0620					
expression	—	+	+	+	+

RT-PCR  
(35 cycles)

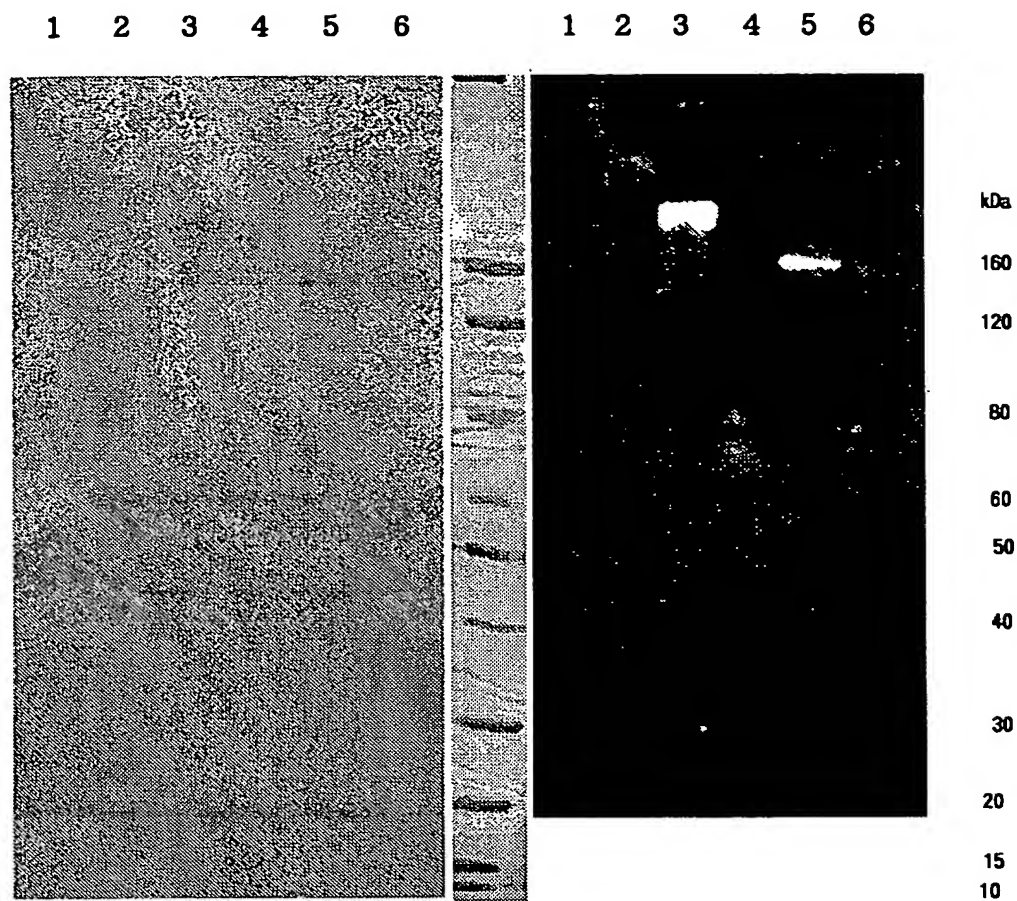
[図6]



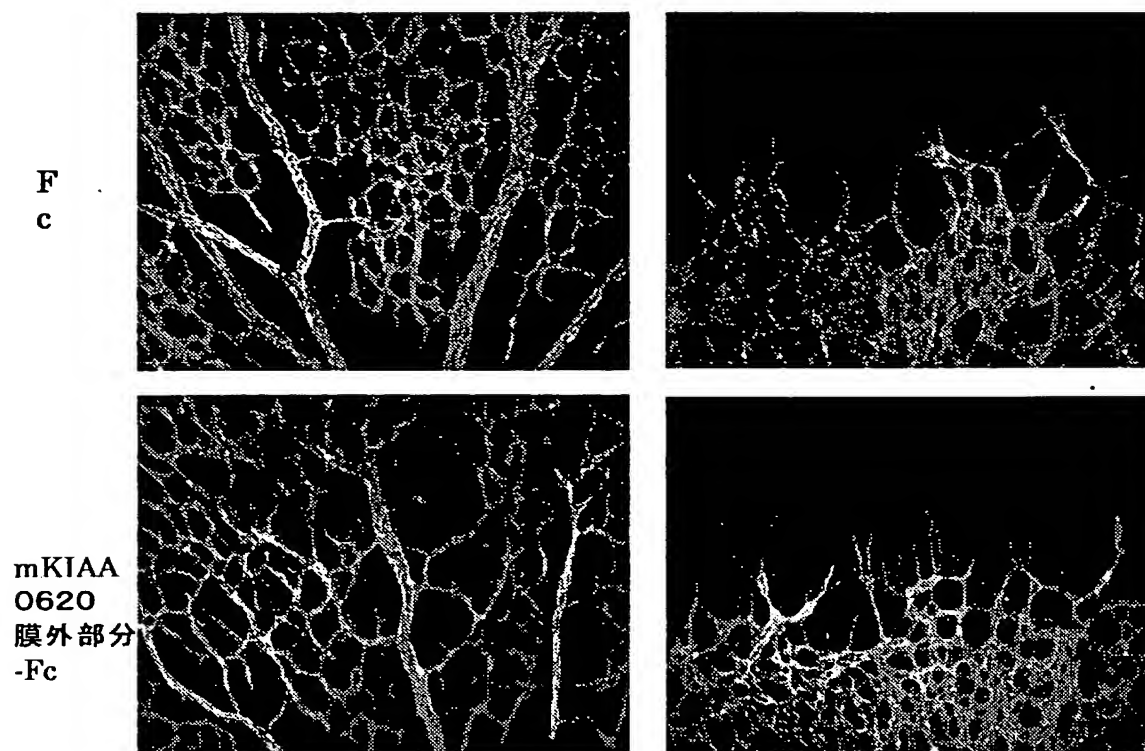
[図7]



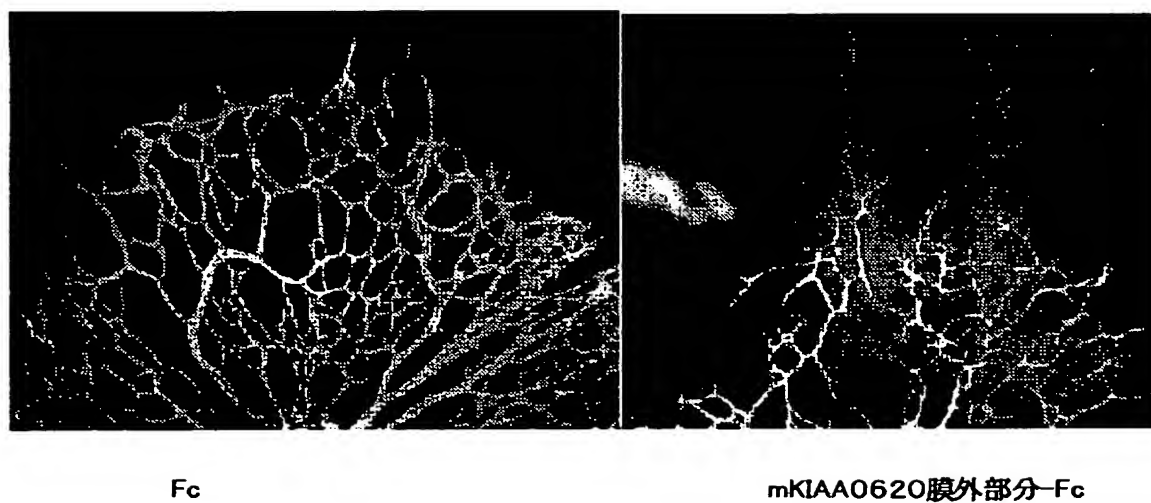
[図8]



[図9]



[図10]



## INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.

PCT/JP2004/015997

## A. CLASSIFICATION OF SUBJECT MATTER

Int.Cl<sup>7</sup> C12N15/09, 5/00, C07K14/705, 16/28, C12Q1/02, 1/68, A61K38/16, A61P43/00, G01N33/15, 33/50

According to International Patent Classification (IPC) or to both national classification and IPC

## B. FIELDS SEARCHED

Minimum documentation searched (classification system followed by classification symbols)

Int.Cl<sup>7</sup> C12N15/00-90, 1/00-7/08, C07K14/00-16/46, C12Q1/00-70

Documentation searched other than minimum documentation to the extent that such documents are included in the fields searched

Electronic data base consulted during the international search (name of data base and, where practicable, search terms used)

JICST FILE (JOIS), EUROPAT (QUESTEL), MEDLINE/BIOSIS/WPIDS (STN), SwissProt/PIR/GeneSeq, Genbank/EMBL/DDBJ/GeneSeq

## C. DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT

Category*	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
X	N. OKAZAKI et al., Prediction of the coding sequences of mouse homologues of KIAA gene: III. the complete nucleotide sequences of 500 mouse KIAA-homologous cDNAs identified by screening of terminal sequences of cDNA clones randomly sampled from size-fractionated libraries, DNA Res., August, 2003, 10(4), p.167-80, ACCESSION: AK129175	1-10
X	B.V.D. ZWAAG, et al., PLEXIN-D1 a novel plexin family member, is expressed in vascular endothelium and the central nervous system during mouse embryogenesis., Dev.Dyn., 2002, 225(3), p.366-43	1-18

☐ Further documents are listed in the continuation of Box C.

☐ See patent family annex.

\* Special categories of cited documents:

"A" document defining the general state of the art which is not considered to be of particular relevance

"E" earlier application or patent but published on or after the international filing date

"L" document which may throw doubts on priority claim(s) or which is cited to establish the publication date of another citation or other special reason (as specified)

"O" document referring to an oral disclosure, use, exhibition or other means

"P" document published prior to the international filing date but later than the priority date claimed

"T" later document published after the international filing date or priority date and not in conflict with the application but cited to understand the principle or theory underlying the invention

"X" document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered novel or cannot be considered to involve an inventive step when the document is taken alone

"Y" document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered to involve an inventive step when the document is combined with one or more other such documents, such combination being obvious to a person skilled in the art

"&" document member of the same patent family

Date of the actual completion of the international search  
27 January, 2005 (27.01.05)

Date of mailing of the international search report  
15 February, 2005 (15.02.05)

Name and mailing address of the ISA/  
Japanese Patent Office

Authorized officer

Facsimile No.

Telephone No.

# INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.

PCT/JP2004/015997

## C (Continuation). DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT

Category*	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
X	WO 2002/081745 A2 (AVENTIS PHARMA S.A.), 17 October, 2002 (17.10.02), SEQ ID NO: 43, 118 (Family: none)	1, 2, 5-10
X	WO 2001/057188 A2 (HYSEQ, INC.), 09 August, 2001 (09.08.01), SEQ ID NO: 729, 2079 & US 2002/0009786 A1 & JP 2003-521251 A	1, 2, 5-10
X	WO 2001/014420 A2 (UNIVERSITY OF TORINO), 01 March, 2001 (01.03.01), (Family: none)	1, 2, 5-10



**INTERNATIONAL SEARCH REPORT**

International application No.

PCT/JP2004/015997

**Box No. II Observations where certain claims were found unsearchable (Continuation of item 2 of first sheet)**

This international search report has not been established in respect of certain claims under Article 17(2)(a) for the following reasons:

1. ☐ Claims Nos.:  
because they relate to subject matter not required to be searched by this Authority, namely:
2. ☒ Claims Nos.: parts of 1, 2, 5 and 19  
because they relate to parts of the international application that do not comply with the prescribed requirements to such an extent that no meaningful international search can be carried out, specifically:  
(See extra sheet.)
3. ☐ Claims Nos.:  
because they are dependent claims and are not drafted in accordance with the second and third sentences of Rule 6.4(a).

**Box No. III Observations where unity of invention is lacking (Continuation of item 3 of first sheet)**

This International Searching Authority found multiple inventions in this international application, as follows:

1. ☐ As all required additional search fees were timely paid by the applicant, this international search report covers all searchable claims.
2. ☐ As all searchable claims could be searched without effort justifying an additional fee, this Authority did not invite payment of any additional fee.
3. ☐ As only some of the required additional search fees were timely paid by the applicant, this international search report covers only those claims for which fees were paid, specifically claims Nos.:
4. ☐ No required additional search fees were timely paid by the applicant. Consequently, this international search report is restricted to the invention first mentioned in the claims; it is covered by claims Nos.:

**Remark on Protest**

- ☐ The additional search fees were accompanied by the applicant's protest.  
☐ No protest accompanied the payment of additional search fees.

# INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.

PCT/JP2004/015997

Continuation of Box No.II-2 of continuation of first sheet(2)

Claims 1, 5 and 19

The term "an amino acid sequence being substantially the same" in the above claims makes the scope of the invention unclear and these claims are not considered as being described in a clear manner. It is stated in the description "an amino acid being substantially the same means ... having a homology of ... about 92.5% or more" (see pages 15 to 16) and the term "about" makes the scope of the invention unclear. It is also unknown whether the term "homology" means amino acids being completely the same as each other or amino acids being highly close to each other.

Claims 1, 2, 5 and 19

It is unknown what part the term "a part of the amino acids" in the above claims means and these claims are not considered as being described in a clear manner.

For example, polypeptides comprising "a part" of the amino acid sequence being the same as the amino acid sequence represented by SEQ ID NO:1 involve polypeptides having no biological activity equivalent to the polypeptide comprising the "full length" of the amino acid sequence. Thus, the inventions according to the above claims are regarded neither as being sufficiently supported by the description nor disclosed in a manner sufficiently clear and complete for the inventions to be carried out by a person skilled in the art.

No international search was made on the inventions relating to "a polypeptide comprising a part thereof" which are not clearly claimed and are neither sufficiently supported by the description nor being disclosed in a manner sufficiently clear and complete therein.

Claims 1, 2, 5 and 19

It is unknown what activity the term "a biological activity" in the above claims means and these claims are not considered as being described in a clear manner.

Although EXAMPLES, etc. are taken into consideration, nothing but a function of an extramembrane domain polypeptide comprising the amino acid sequence represented by SEQ ID NO:18 of inhibiting mouse newborn retinal angiogenesis is disclosed as "a biological activity". Concerning other activities, it is unknown what activities the peptide according to the above claims has. Thus, the inventions according to the above claims are regarded neither as being sufficiently supported by the description nor being disclosed in a manner sufficiently clear and complete for the inventions to be carried out by a person skilled in the art.

## A. 発明の属する分野の分類 (国際特許分類 (IPC))

Int. Cl<sup>1</sup> C12N 15/09, 5/00, C07K 14/705, 16/28, C12Q 1/02, 1/68, A61K 38/16, A61P 43/00, G01N 33/15, 33/50

## B. 調査を行った分野

## 調査を行った最小限資料 (国際特許分類 (IPC))

Int. Cl<sup>1</sup> C12N 15/00-90, 1/00-7/08, C07K 14/00-16/46, C12Q 1/00-70

最小限資料以外の資料で調査を行った分野に含まれるもの

## 国際調査で使用した電子データベース (データベースの名称、調査に使用した用語)

JICSTファイル(JOIS), EUROPAT(QUESTEL), MEDLINE/BIOSIS/WPIDS(STN), SwissProt/PIR/GeneSeq, Genbank/EMBL/DDBJ/GeneSeq

## C. 関連すると認められる文献

引用文献の カテゴリー*	引用文献名 及び一部の箇所が関連するときは、その関連する箇所の表示	関連する 請求の範囲の番号
X	N. OKAZAKI, et. al, Prediction of the coding sequences of mouse homologues of KIAA gene: III. the complete nucleotide sequences of 500 mouse KIAA-homologous cDNAs identified by screening of terminal sequences of cDNA clones randomly sampled from size-fractionated libraries, DNA Res., Aug 2003, 10 (4), p.167-80, ACCESSION: AK129175	1-10

☒ C欄の続きにも文献が列举されている。

☐ パテントファミリーに関する別紙を参照。

## \* 引用文献のカテゴリー

「A」特に関連のある文献ではなく、一般的技術水準を示すもの

「E」国際出願日前の出願または特許であるが、国際出願日以後に公表されたもの

「L」優先権主張に疑義を提起する文献又は他の文献の発行日若しくは他の特別な理由を確立するために引用する文献 (理由を付す)

「O」口頭による開示、使用、展示等に言及する文献

「P」国際出願日前で、かつ優先権の主張の基礎となる出願

の日の後に公表された文献

「T」国際出願日又は優先日後に公表された文献であって出願と矛盾するものではなく、発明の原理又は理論の理解のために引用するもの

「X」特に関連のある文献であって、当該文献のみで発明の新規性又は進歩性がないと考えられるもの

「Y」特に関連のある文献であって、当該文献と他の1以上の文献との、当業者にとって自明である組合せによって進歩性がないと考えられるもの

「&」同一パテントファミリー文献

国際調査を完了した日

27.01.2005

国際調査報告の発送日

国際調査機関の名称及びあて先

日本国特許庁 (ISA/J P)

郵便番号 100-8915

東京都千代田区霞が関三丁目4番3号

特許庁審査官 (権限のある職員)

阪野 誠司

4 N

9 2 8 6

電話番号 03-3581-1101 内線 3448

C (続き) . 関連すると認められる文献		
引用文献の カテゴリー*	引用文献名 及び一部の箇所が関連するときは、その関連する箇所の表示	関連する 請求の範囲の番号
X	B. V. D. ZWAAG, et. al, PLEXIN-D1, a novel plexin family member, is expressed in vascular endothelium and the central nervous system during mouse embryogenesis, Dev Dyn., 2002, 225(3), p. 336-43	1-18
X	WO 2002/081745 A2 (AVENTIS PHARMA S. A.), 2002.10.17, SEQ ID NO: 43, 118 (ファミリーなし)	1, 2, 5-10
X	WO 2001/057188 A2 (HYSEQ, INC.), 2001.08.09, SEQ ID NO: 729, 2079 & US 2002/0009786 A1 & JP 2003-521251 A	1, 2, 5-10
X	WO 2001/014420 A2 (UNIVERSITY OF TORINO), 2001.03.01 (ファミリーなし)	1, 2, 5-10

## 第Ⅱ欄 請求の範囲の一部の調査ができないときの意見 (第1ページの2の続き)

法第8条第3項 (PCT 17条(2)(a)) の規定により、この国際調査報告は次の理由により請求の範囲の一部について作成しなかった。

1. ☐ 請求の範囲 \_\_\_\_\_ は、この国際調査機関が調査をすることを要しない対象に係るものである。つまり、
2. ☒ 請求の範囲 1, 2, 5, 19の一部 は、有意義な国際調査をすることができる程度まで所定の要件を満たしていない国際出願の部分に係るものである。つまり、  
特別ページを参照。
3. ☐ 請求の範囲 \_\_\_\_\_ は、従属請求の範囲であってPCT規則6.4(a)の第2文及び第3文の規定に従って記載されていない。

## 第Ⅲ欄 発明の単一性が欠如しているときの意見 (第1ページの3の続き)

次に述べるようにこの国際出願に二以上の発明があるところの国際調査機関は認めた。

1. ☐ 出願人が必要な追加調査手数料をすべて期間内に納付したので、この国際調査報告は、すべての調査可能な請求の範囲について作成した。
2. ☐ 追加調査手数料を要求するまでもなく、すべての調査可能な請求の範囲について調査することができたので、追加調査手数料の納付を求めなかった。
3. ☐ 出願人が必要な追加調査手数料を一部のみしか期間内に納付しなかったため、この国際調査報告は、手数料の納付のあった次の請求の範囲のみについて作成した。
4. ☐ 出願人が必要な追加調査手数料を期間内に納付しなかったため、この国際調査報告は、請求の範囲の最初に記載されている発明に係る次の請求の範囲について作成した。

## 追加調査手数料の異議の申立てに関する注意

- ☐ 追加調査手数料の納付と共に出願人から異議申立てがあった。
- ☐ 追加調査手数料の納付と共に出願人から異議申立てがなかった。

## 請求の範囲 1、5、19

上記請求の範囲における「実質的に同一のアミノ酸配列」という記載は、発明の範囲を不明確とするものであり、上記請求の範囲は、明確に記載されているとはいえない。即ち、明細書中、「実質的に同一なアミノ酸配列とは、・・・相同性の程度が、・・・約92.5%以上」とあるが（第15-16頁参照）、「約」という記載は、発明の範囲を不明確とするものである。また、「相同性」とは、アミノ酸どうしが完全に一致することを意味するのか、類似したアミノ酸が一致することを意味するのか不明である。

## 請求の範囲 1、2、5、19

上記請求の範囲における「アミノ酸の一部」は、どの部分を示しているか不明であり、上記請求の範囲は、明確に記載されているとはいえない。

また、例えば、配列番号：1で示されるアミノ酸配列と同一のアミノ酸配列の「一部」からなるポリペプチドは、該アミノ酸配列の「全部」からなるポリペプチドと同質の生物学的活性を有しないポリペプチドを含んでいる。したがって、上記請求の範囲に係る発明について、明細書に十分に裏付けられているとはいえないし、当該技術分野の専門家が実施することができる程度に明確かつ十分に開示されているとはいえない。

なお、請求の範囲が明確に記載されておらず、また、明細書に十分な裏付けがされておらず、明細書に明確かつ十分に開示されていない「一部から成るポリペプチド」に係る発明については、国際調査を行っていない。

## 請求の範囲 1、2、5、19

上記請求の範囲における「生物学的活性」は、どのような活性か不明であり、上記請求の範囲は、明確に記載されているとはいえない。

また、実施例等を見ても、「生物学的活性」として開示されているものは、配列番号：18で示されるアミノ酸配列からなる膜外領域ポリペプチドが、新生仔マウス網膜血管発生を阻害する作用のみである。それ以外の活性については、実際に上記請求項に係るペプチドがどのような活性を有しているか不明である。したがって、上記請求の範囲に係る発明について、明細書に十分に裏付けられているとはいえないし、当該技術分野の専門家が実施することができる程度に明確かつ十分に開示されているとはいえない。